



Fonction des neurotrophines et de la neurotensine dans l'oncogénèse lymphocytaire B

Sofiane Saada

► To cite this version:

Sofiane Saada. Fonction des neurotrophines et de la neurotensine dans l'oncogénèse lymphocytaire B. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2015. Français. NNT : 2015LIMO0021 . tel-01296755

HAL Id: tel-01296755

<https://theses.hal.science/tel-01296755>

Submitted on 1 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LIMOGES
ECOLE DOCTORALE Biologie Santé ED 524
Equipe d'Accueil 3842

Thèse
pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Immunologie-Oncologie

Présentée et soutenue par

Sofiane SAADA

Le 19 Mars 2015

**Fonction des neurotrophines et de la neurotensine dans
l'oncogenèse lymphocytaire B**

Thèse co-dirigée par **Pr Marie-Odile JAUBERTEAU**
et **Pr Anne-Laure FAUCHAIS**

JURY :

Président du jury :

Pr Dominique BORDESSOULE, PU-PH, UMR CNRS7276, Université de Limoges

Rapporteurs

- Pr Djillali SAHALI, PU-PH, INSERM U955, Service de Néphrologie, Hôpital Henri Mondor, Université Paris-Est

- Dr Jean MAZELLA, DR-CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Nice Sophia Antipolis

Examineurs

- Dr Florence ADER, MCU-PH-HDR, INSERM U851, Université Lyon 1,

- Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU, EA 3842, Université de Limoges, (Directrice de thèse)

- Professeur Anne-Laure FAUCHAIS, EA 3842, Université de Limoges, (Directrice de thèse).

Membre invité :

- Pr Danielle TROUTAUD, EA 3842 Université de Limoges

Remerciements

Je tiens à exprimer en tout premier lieu ma reconnaissance aux membres du Jury :

- Aux rapporteurs :
 - Monsieur le Professeur Djillali SAHALI, PU-PH, Université Paris-Est.
 - Monsieur le Docteur Jean MAZELLA, Directeur de recherche CNRS, Université de Nice Sophia Antipolis.
- Aux examinateurs :
 - Madame le Docteur Florence ADER, MCU-PH, Université Lyon 1.
 - Madame le Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU, PU-PH Université de Limoges.
 - Madame le Professeur Anne-Laure FAUCHAIS, PU-PH Université de Limoges.
 - Madame le Professeur Danielle TROUTAUD, PU à l'Université de Limoges.

Pour l'attention, l'intérêt et le temps consacré à la lecture de ces travaux. Soyez assurés, Mesdames, Messieurs, de mon profond respect et ma sincère reconnaissance.

Je souhaite également exprimer toute ma gratitude à Madame le Professeur Dominique BORDESSOULE, PU-PH Université de Limoges. Recevez, Madame le Professeur, toute mon estime et mes plus sincères remerciements.

Mes remerciements s'adressent maintenant aux Professeurs Marie-Odile JAUBERTEAU et Anne-Laure Fauchais, qui m'ont fait l'honneur de co-encadrer cette thèse. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de ce parcours. Travailler avec vous est toujours un plaisir et un ravissement. Merci également pour votre enthousiasme et votre passion que vous dégagéz devant un résultat et merci de m'avoir épaulé quand les résultats étaient moins nombreux. Un grand merci à vous deux pour vos qualités pédagogiques et scientifiques, j'ai beaucoup appris à vos côtés.

Je tiens également à remercier mon encadrant de M2 le Professeur Dil SAHALI, grâce à vous ma passion pour la recherche a pris des dimensions supérieures, au cours des quelques mois que j'ai passés au sein de votre équipe.

Je remercie également Danielle TROUTAUD qui m'a donné la chance de rentrer dans ce domaine au cours de mon Master.

Je souhaite également remercier l'ensemble de l'équipe l'EA3842, qui ont fait de ces trois années de thèse un moment si intense et intéressant.

UN GRAND MERCI à Thomas (alias Dark) pour ta présence, ton soutien et ton aide indéfectible, merci pour ta gentillesse en toutes circonstances, merci à toi et à ta petite famille pour tout ce que nous avons partagé.

Merci à Fabrice LALLOUE, pour votre disponibilité et vos nombreux soutiens. Et surtout pour votre enthousiasme et votre passion, l'échange avec vous que ça soit en science ou en dehors, et toujours un grand moment de partage, j'ai énormément appris avec vous,

Je remercie Barbara BESSETTE, pour ton soutien....tes soutiens en toutes circonstances,

J'adresse de chaleureux remerciements à Cornelia, pour ton attention de tout instant sur mes travaux, pour tes conseils avisés, et ton aide précieuse, merci pour toute cette énergie et pour ta gentillesse,

Je tiens aussi à remercier Kim et Hussein (Akil. H), pour les séances de culture cellulaire à rallonge, incrémentées de discussions scientifiques et moins scientifiques,

J'adresse mes remerciements à Serge pour toute cette bonne humeur et la bonne ambiance que tu fais régner quotidiennement au sein du labo,

Je remercie la « BERBERIAN-B Cell Team » Hafidha et Amazigh, les nouveaux compagnons de bureau et pour cette colocation réussie, mais aussi pour leur gentillesse, et leur compréhension. Merci HAFIDHA pour ta bonne humeur permanente. Merci également pour toutes les fois où tu nous a préparé d'AGHROUM » (pain berbère)...

Je remercie également Sandra, Même si tu nous as quitté pour « excellence-bis » le petit mot que t'a laissé Pierrot (welcome) est toujours collé au mur...

Pour continuer avec les gens bizarres... Monsieur « Exosooooooooouumeeee » Monsieur Vodka-Orange, Hussein, Bienvenue dans ce beau groupe. Bienvenue également à Miguellitttooo

Soha, les remerciements mutuels s'annulent donc ... pas besoin d'un long discours, je passe ma thèse avant toi, donc bon courage pour la tienne. On va y arriver.

Sans oublier mes prédécesseurs, Romain (notre ChouChoutte adorée), Pierrot, Lydie et Carole pour tous ces moments partagés dans la bonne humeur.

Amel la chiante... pour rappel c'est toi qui a écrit ça. Ben en fait non, on a passé de loooooooooooooongues soirées à rédiger et à se soutenir mutuellement. Merci également pour les nombreux dépannages en enseignements, surveillances d'exams, décalages de plannings La Fac des Sciences quoi.

Merci à Miguelitto, l'espagnol du groupe, Nico (en définitif, je ne sais toujours pas si tu fais partie de notre équipe), PAF, Ludo

Merci à Aurélie (ou les Aurélie(s), comme dirais Pierre), pour votre bonté et votre bonne humeur.

Merci également à Niki, Sabrina, mais aussi aux nouveaux Sophie, Safaê, Amel R. Julie(s).... Pour votre bonne humeur quotidienne.

Un grand merci également à Chloé, particulièrement pour m'avoir sauvé la mise pour les TPs, en même temps échanger de la BioCell contre l'étude des plastes tu gagnais aux changes. ...Je te revaudrai ça

Merci aux amis du 5ème également, particulièrement Lamia, merci pour ton soutien et tes conseils.

Spéciale dédicace à Mini mouse, qui en parallèle de ces cultures primaires mésenchymateuses, joue au réparateur d'ordinateur capricieux de logiciels corrompus « EndNote... » Je ne sais comment te remercier... merci tout de même ^^

Merci à PhiPhi qui sait toujours remettre la bonne blague pour chaque situation....plutôt grâce à un bouquin Magic.

Je remercie également l'ensemble des statutaires de l'équipe pour leur disponibilité, merci à Mireille et Marie-Hélène pour votre bonne humeur.

Je termine ces remerciements par ceux grâce à qui j'ai l'occasion aujourd'hui d'écrire ces remerciements.....Mes parents mais aussi mes frères (Youva et Massy), et ma soeur Yasmine et belle soeur Sabrina. Je ne prétends pas pouvoir vous remercier en quelques lignes pour tout ce que vous représentez pour moi, et pour tout ce que vous m'avez apporté.

Liste des abréviations:

A2A-R: Adenosine Receptor Subtype A2a
ADAM: A Disintegrin And Metalloprotease
AGO2: Argonaute-2
AMPC: Adenosine Mono-Phosphate cyclique
APP-1: Amyloid precursor protein-1
BACE1: β -site β -amyloid precursor protein (APP)-cleaving enzyme 1
Bcl-2: B-Cell Lymphoma-2
BDNF: Brain-derived Neurotrophic Factor
Bfl-1: BCL2-related protein A1
CARD: Caspase Recruitment Domain
CGRP: Calcitonin Gene-Related Peptide
CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor
CNTF-R α : Ciliary Neurotrophic Factor-Receptor α
ConA: Concanavaline A
CPA: Cellules présentatrices d'Antigènes
CRD: Cystein Rich Domain
DAG: Di-Acyl Glycérol
DD: Death Domain
DLBCL: Diffuse Large B Cell Lymphomas
EAE: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
EBV: Epstein Barr Virus
EGF: Epidermal Growth Factor
Erk: Extracellular-signal-Regulated Kinase
ESCRTs: Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FSH: Follicle-Stimulating Hormone
Gab1: GRB2-associated-binding protein-1
Glut-4: Glucose transporter type-4
GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
Grb2: Growth factor receptor-bound protein-2
HRS: Hepatocyte growth factor-Regulated Tyrosine kinase Substrate
Hsc70: Heat shock cognate protein-70
Hsp90: Heat shock protein-90
IFN- γ : interféron γ
IP3: Inositol 3-Phosphate
IgE: Immunoglobuline de classe E
IL: Interleukine
ILV: Intraluminal Vesicule
IRAK-1: Interleukin-1 Receptor Associated Kinase-1
JNK: c-Jun N-terminal Kinase
Kd: constante de dissociation
KO: Knockout

KSHV: Herpesvirus Kaposi Sarcoma-associated Virus
LED: Lupus Erythémateux Disséminé
L'ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport
LIF: Leukemia Inhibitor Factor
LHRH: Luteinizing Hormone Releasing Hormone
Lingo-1: LRR and Ig domain-containing Nogo-receptor interacting protein-1
LPA-Receptor: Lysophosphatidate Receptor
LpL: Lipoprotéine Lipase
LPS: Lipopolysaccharide
MAG: Myelin-Associated Glycoprotein
MAGE: melanoma-associated antigen
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
MBGI-Complex: Myelin-Based Growth Inhibitors complex
MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein-1
MFG-E8: Milk Fat Globule-EGF factor-VIII
MIP-2: Macrophage Inflammatory Protein-2
MMPs: Matrix Metalloproteinases
MVB: Microvesicular Bodies
MVB12: Multivesicular Body sorting factor-12
NADE: p75^{NTR} Associated Cell death Executor
NEEP-21: Neuron-enriched endosomal protein de-21 kDa
NF- κ B: Nuclear Factor- κ B
NGF: Nerve Growth Factor
NN: Neuromédine
Nogo-R ou RTN4R : Réticulon-4 Receptor
NRAGE: Neurotrophin Receptor-interacting MAGE homolog
NRH-2: Neurotrophins Receptor Homolog-2
NRIF: Nuclear Receptor Interacting Factor
NO-synthase: Nitric Oxide-synthase
NT: Neurotrophine
NT-3 ou NTF-3: Neurotrophin-3 ou Neurotrophin Factor-3
NT-4/-5 ou NTF-4/-5: Neurotrophin-4/-5 ou Neurotrophin Factor-4/-5
NTSRs: Neurotensin Receptors
OMgp: Myelin Oligodendrocyte glycoprotein
OSM: Oncostatine M
p75^{NTR}-ECD: ECD : Extra Cellular Domain
p75^{NTR}-CTF: C-Terminal Fragment
p75^{NTR}-ICD: ICD : Intra Cellular Domain

PAGE-SDS: Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis- Sodium Dodecyl-Sulfate
PARP: Poly ADP-Ribose Polymerase
PDGFR: Platelet Derived Growth Factor-Receptor
PHA: Phytohémaglutinine
PI3K: Phosphatidylinositol-3 Kinase
PI3P: phosphatidyl-Inisitol-3 Phosphate
PIP2: Phosphatidyl-Inositol-4,5-Diphosphate
PKC: Protein Kinase C
PLC-γ: Phospholipase C- γ
PMA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PPP2CA: Protein Phosphatase-2, Catalytic subunit, Alpha isozyme
P TEN: Phosphatase and TENsin homolog
RAP: Receptor-Associated Protein
RCPG: Récepteurs Couplés à des Protéines-G
RhoA: Ras-homology gene family, membre A
Rho-GDI: Rho-GDP Dissociation Inhibitor
Rho-GTPase: Ras-like Protein-Guanosine Tri-Phosphatase
RIP-2: Receptor Interacting Protein-2
RISC: RNA-Induces Silencing Complex
RTK: Recepteur à domaine Tyrosine Kinase
S1P₁: Sphingosine 1-Phosphate-Receptor
SAP: Sphingolipid Activator Protein
SC-1: schwann cell factor-1
SCF: Stem Cell Factor
SEP: Sclérose En Plaque
Sh3: Src homology 3
siRNAs: small interference RNAs
SOCS1: Suppressor of Cytokine Signaling-1

Sort1: Sortilin
STAM-1 et -2: Signal Transducing Adaptor Molecule -1 et -2
TACE: Tumor Necrosis Factor α-Converting Enzyme
TBNS: acide 2,4,6-Trinitro-Benzène Sulfonique
TES: TrkB-EGFR-Sortiline
TGN: Trans-Golgi Network
Th1: T lymphocyte Helper type-1
Th2: T lymphocyte Helper type-2
Th17: T lymphocyte Helper type-17
TNF-α: Tumor Necrosis Factor-α
TNF-R: Tumor Necrosis Factor – Receptor
TRAF-6: TNF Receptor Associated Factor
TRAPS: TNF receptor-associated periodic syndrome
Treg: Regulatory T lymphocyte
TrkB: Tropomyosine related Kinase B
TrkB-FL: TrkB-Full Length
TrkB-T1: TrkB-Truncated 1
TrkB-T-shc: TrkB-Truncated-shc
TrkC: Tropomyosine related Kinase C
TrkC-T: TrkC-Truncated
Tsg101: Tumor Susceptibility Gene 101
UBAP-1: Ubiquitin Associated Protein-1
VAMP7: Vesicle-associated membrane protein-7
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
Vps10-D: Vacuolar protein sorting-10 Domain
Vps28 ou 37: Vacuolar protein sorting 28 ou 37 homolog
XPB-1: X-Box Binding protein-1

Table des matières

Introduction.....	12
Revue bibliographique.....	16
I. Les neurotrophines.....	17
1. Généralités :.....	17
2. Biogenèse des neurotrophines:	19
3. Les récepteurs aux neurotrophines :.....	20
4. Structure et biologie des récepteurs aux neurotrophines :.....	22
4. 1. Les récepteurs Trk (Tropomyosin-related kinase) :.....	22
4. 2. Les Isoformes des récepteurs Trks:.....	24
4. 2. a. TrkA :.....	24
4. 2. b. TrkB:.....	25
4. 2. c. TrkC :.....	27
4. 3. Le récepteur p75 ^{NTR} :.....	29
4. 3. a. Structure de la protéine p75 ^{NTR} :.....	29
4. 3. b. Les isoformes de p75 ^{NTR} :.....	31
4. 4. Les voies de signalisations du récepteur p75 ^{NTR} :.....	32
4. 5. Les corécepteurs de p75 ^{NTR} :	35
4. 5. a. Nogo et LINGO-1:.....	35
4. 5. b. Les hétéro-dimères p75 ^{NTR} -Trk :	35
4. 5. c. p75 ^{NTR} et la sortiline:.....	36
5. Neurotrophines et système immunitaire:.....	38
5. 1. Les neurotrophines dans les organes hématopoïétiques	38
5. 2. Neurotrophines et lymphocytes B :	40
5. 2. a. NGF et Lymphocyte B :.....	40
• Expression du NGF et de ces récepteurs au niveau lymphocytaire B :	40
• Modulation de la production d'immunoglobulines par le NGF :	40
• Production autocrine et activation B	40
• NGF et modulation de la réponse immune :.....	41
• NGF et résistance à l'apoptose dans les cellules B tumorales :.....	41
5. 2. b. BDNF et Lymphocyte B :	42
• Expression du BDNF et de ces récepteurs au niveau lymphocytaire B	42
• Production autocrine et activation B :	43

• BDNF, résistance à l'apoptose et prolifération des cellules B tumorales :	43
5. 2. c. NT-3 et Lymphocyte B :	44
5. 3. Neurotrophines et lymphocyte T:	45
5. 3. a. Le NGF et lymphocyte T :	45
5. 3. b. BDNF et lymphocyte T :	46
5. 3. c. NT-3 et lymphocyte T :	47
5.4. Neurotrophines et les autres cellules du système immunitaire.....	48
5. 4. a. Neurotrophines et lymphocytes NK (Natural Killer) :	48
5. 4. b. Neurotrophines et monocytes/macrophages :	48
5. 4. c. Neurotrophines et mastocytes :	49
5. 4. d. Neurotrophines et polynucléaires/neutrophiles :	49
• 5. 4. d. i. Les éosinophiles :	49
• 5. 4. d. ii. Les basophiles:	50
II. La Neurotensine:	51
1. Généralités :	51
2. Neurotensine et système nerveux central :	53
3. Neurotensine dans le tube digestif :	55
4. Les récepteurs à la neurotensine :	56
4. 1. NTSR1:	57
4. 1. a. Structure :	57
4. 1. b. Localisation tissulaire, signalisation et régulation :	58
• Localisation tissulaire :	58
• Inactivation de NTSR1 et réponse à la neurotensine :	59
• Régulation de l'expression membranaire du récepteur NTSR1 :	59
• Signalisation intracellulaire induite par la fixation de la NTS sur NTSR1:	61
• Localisation cellulaire de NTSR1 et modulation de la signalisation : .	62
4. 2. NTSR2:	63
4. 2. a. Structure :	63
4. 2. b. Localisation tissulaire et régulation:	64
4. 3. NTSR3/Sortiline :	66
4. 3. a. Structure :	66
• Structure de la sortiline et protéines apparentées :	66
• Clivage des domaines extra- et intra-cellulaires de la sortiline :	67
• Sortiline : co-récepteur membranaire :	69

• Régulation de la localisation cellulaire de la sortiline :	70
• Autres fonctions cellulaires de la sortiline :	71
5. Neurotensine (NTS) et système immunitaire:	71
5.1. Neurotensine et lymphocytes T :	71
5.2. Neurotensine et cytokines pro-inflammatoires :	72
5.3. Neurotensine et cellules mastocytaires	72
5.4. Neurotensine, cellules dendritiques et cellules phagocytaires :	73
6. Sortiline et système immunitaire :	73
7. Neurotensine et Cancer :	76
7. 1. NTSR1 et Cancer:	76
7.1. a. NTSR1 et cancer colique :	77
7.1. b. NTSR1 et autres adénocarcinomes :	78
7. 2. NTSR2 et Cancer :	80
7. 3. NTSR-3/Sortiline et Cancer :	81
8. Interactions NTSRs – RTK (Récepteurs à Tyrosine Kinases) :	82
III. Trafic endosomal et exosomes	87
1. Généralités :	87
2. Trafic endosomal et exosomes:	88
3. Exosomes, composition et origine :	89
3. 1. Exosomes et régulation par les complexes ESCRT :	92
3. 1. a. ESCRT-0 :	92
3. 1. b. ESCRT-I :	93
3. 1. c. ESCRT-II :	93
3. 1. d. ESCRT-III :	94
3. 2. Exosomes et les tetraspanines:	95
3. 3. Exosomes et Céramides:	96
3. 4. Exosomes et ARNs :	97
3. 5. Sécrétion des exosomes induite par l'oligomérisation de protéines :	97
4. Exosomes et immunité anti-tumorale :	98
Résultats	102
Résultats I - Expression de la neurotensine et de ses récepteurs par les lymphocytes B humains : rôle dans l'homéostasie cellulaire	104
Résultats II – Interactions des récepteurs NTSR2 et TrkB dans la survie lymphocytaire B	117
Discussion	152
ANNEXE 1	199

Liste des figures

Figure 1: Illustration schématique de l'évolution des neurotrophines basée sur les séquences en acides aminés, chez différentes espèces.	18
Figure 2 : illustration schématique de la structure primaire des neurotrophines	19
Figure 3 : Illustration schématique des différents récepteurs aux neurotrophines	21
Figure 4 : Illustration schématique de l'évolution des récepteurs Trk basée sur les séquences en acides aminés, chez différentes espèces	22
Figure 5 : Illustration schématique de la structure des récepteurs Trks	23
Figure 6 : Illustration des principales isoformes issues de l'épissage alternatif du transcrit du gène de TrkA (NTRK1)	25
Figure 7 : Illustration des principales isoformes issues de l'épissage alternatif du transcrit du gène de TrkB (NTRK2).	27
Figure 8 : Illustration des principales isoformes issues de l'épissage alternatif du transcrit du gène de TrkC (<i>NTRK3</i>)	28
Figure 9 : Illustration schématique de la structure du récepteur $P75^{NTR}$	30
Figure 10: Illustration schématique des voies de signalisation activées par le récepteur $p75^{NTR}$	34
Figure 11 : Illustration des différents co-récepteurs de $p75^{NTR}$ et des conséquences de leur activation selon leurs ligands.....	37
Figure 12 : Illustration schématique de l'implication du NGF dans la mise en place des profils d'activation lymphocytaires dans les manifestations allergiques inflammatoires	46
Figure 13 : Représentation schématique de la transcription du gène codant pour la protéine précurseur, la pro-Neurotensine/Neuromédine N (Pro-NTS/NN) et les étapes de sa maturation	52
Figure 14 : Représentation schématique comparative des structures des récepteurs NTSR1 et NTSR2 chez le rat	56
Figure 15 : Représentation schématique de la structure chimique linéaire de la NTS (a) et des antagonistes non peptidiques des récepteurs NTSRs.	61
Figure 16 : Illustration schématique de la signalisation intracellulaire induite par la stimulation du récepteur NTSR1 par la NTS et associée à la cancérogenèse.....	62
Figure 17: Illustration schématique des structures protéiques des membres de la famille des protéines à domaine Vps10, la Sortiline/NTSR-3.....	69
Figure 18 : Illustration schématique de l'interaction fonctionnelle entre les récepteurs RTK-RCPG.....	84

Liste des tableaux

Tableau 1 : Illustration du niveau d'expression de la neurotensine dans les différents tissus périphériques (non neuronaux)	55
Tableau 2 : Illustration des différences caractéristiques physiques et biochimiques des différentes vésicules extracellulaires sécrétées	90

Introduction

Les neurotrophines (NT) sont des facteurs de croissance initialement découverts dans le système nerveux et ayant pour rôle de contrôler la croissance, la prolifération et la survie des cellules neuronales et astrocytaires [1]. Leur rôle pléiotrope s'est ensuite étendu à de nombreux autres tissus tels que le foie, le pancréas, le tube digestif, les tissus synoviaux, le système immunitaire. Les NT les plus étudiées sont le NGF (*Nerve Growth Factor*), le BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), la neurotrophine 3 (NT-3 ou NTF-3 : *Neurotrophin Factor-3*) et la neurotrophine 4/5 (NT-4/5) [2-4].

Les NT sont des neuropeptides synthétisés sous forme de précurseurs (pré- et pro-neurotrophines) qui subissent une série de clivages protéolytiques à différents niveaux, dans le réticulum endoplasmique, dans l'appareil de Golgi et dans le milieu extracellulaire. Ce processus de maturation peut ne pas aller à son terme, générant des formes immatures, les pro-neurotrophines (pro-NT). Les fonctions biologiques des NT et des pro-NT sont différentes et peuvent intervenir dans l'homéostasie cellulaire notamment la balance survie / apoptose.

Les neurotrophines peuvent interagir avec leurs récepteurs de haute affinité Trks (*Tropomyosin-related kinase*) : TrkA (NTRK1), TrkB (NTRK2) et TrkC (NTRK3), qui lient respectivement le NGF, le BDNF (et la NT-4/5) et la NT-3. Ces interactions favorisent la survie cellulaire dans des conditions de stress cellulaire [4, 5].

Les pro-NT interagissent également avec un autre récepteur, p75^{NTR}, un récepteur à domaine de mort. L'interaction des pro-NT avec un récepteur hétéro-dimérique formé de p75^{NTR} et d'un co-récepteur, la sortiline, induit la mort cellulaire [6-10]. La sortiline est exprimée dans les lymphocytes B humains, les lignées de lymphome B et de myélome au sein desquels elle régule négativement une boucle de survie anti-apoptotique induite par la liaison du BDNF au récepteur TrkB, le complexe p75^{NTR}/sortiline induisant la mort cellulaire après liaison au pro-BDNF [11]. Le récepteur p75^{NTR} peut également induire la survie cellulaire, notamment par son interaction avec les récepteurs Trks.

Les NT et leurs récepteurs apparaissent ubiquitaires au niveau des cellules du système immunitaire, le NGF, le BDNF et la NT-3 pouvant induire la prolifération, l'activation ou la survie de ces cellules en situations basale, inflammatoire ou pro-apoptotique [12-15].

Les travaux précédemment réalisés au sein de notre équipe ont mis en évidence une boucle de régulation autocrine, dépendantes des NT, au sein des lignées lymphocytaires B humaines, à différents stades de différenciation. En réponse à un stress cellulaire induit par une privation sérique et/ou l'induction de l'apoptose par activation de Fas, les cellules produisent du BDNF qui agit de manière autocrine sur son récepteur spécifique, TrkB [11]. L'induction de la production du BDNF impliquait une régulation de la production et de la sécrétion de ce neuropeptide dans les cellules. Le transport du BDNF est assuré par la sortiline, une protéine à domaine Vps10, également connue comme co-récepteur de p75^{NTR}. Il a été démontré pour la première fois que la sortiline était exprimée dans les lymphocytes B, quel que soit le stade de leur développement [11].

La sortiline peut également lier un autre neuropeptide, la Neurotensine (NTS), et porte également le nom de NTSR3 pour *Neurotensin Receptor-3*. La neurotensine, un petit peptide de 13 acides aminés, a été identifiée dans le système nerveux, où elle joue un rôle de neurotransmetteur, impliquée dans l'analgésie et la thermorégulation. Elle est également présente dans le tube digestif, où elle est impliquée dans la régulation de la digestion et le contrôle et de la glycémie [16-21]. La fonction de la neurotensine est associée à l'activation des deux récepteurs à protéine G, le récepteur de haute affinité, NTSR1 et le récepteur de faible affinité, NTSR2 ainsi qu'au récepteur de type I, non couplé à des protéines-G, NSTR3 (ou sortiline). La NTS est impliquée dans l'oncogenèse de nombreux cancers solides via sa liaison au récepteur NTSR1 principalement mais également au récepteur NTSR2 dans des modèles de cancer pancréatique et prostatique. En revanche, les données concernant l'implication de la NTS et de ses récepteurs dans l'oncogenèse B restent parcellaires, seule la présence de la sortiline ayant été mise en évidence dans différentes lignées B matures et plasmocytaires.

L'expression et le rôle régulateur de la NTS et de ses récepteurs n'ayant jusqu'alors jamais été étudiés dans les lymphocytes B normaux et cancéreux, ni dans les lignées lymphocytaires B, nos objectifs ont été :

1)- De vérifier l'expression de la NTS et de ses récepteurs à différents stades du développement lymphocytaires B, dans des lignées lymphocytaires B dans un

premier temps, puis dans des lymphocytes B de sujets sains et/ou atteints de pathologies lympho-prolifératives B (lymphome B, leucémie lymphoïde chronique).

2)- De rechercher l'implication de la NTS et de ces récepteurs NTSR1, NTSR2 ainsi que de la sortiline, dans les mécanismes de survie et d'apoptose cellulaire.

3)- Plusieurs travaux ont montré l'importance et l'implication de l'axe NTS/NTSR-1 dans la cancérogenèse [22, 23]. Etant donné la double fonction de la sortiline, à la fois comme récepteur de la neurotensine et des neurotrophines, l'objectif de cette étude a également été de rechercher l'interaction potentielle des deux voies neuropeptidiques et leurs implications éventuelles dans l'oncogenèse lymphocytaire B.

4)- Le trafic intra-cellulaire de ces récepteurs sera également abordé afin d'identifier la possibilité, d'une part, d'une régulation de leur localisation membranaire ou endosomale, et d'autre part, de leur sécrétion exosomale.

Revue bibliographique

I. Les neurotrophines

1. Généralités :

Aux débuts des années 50, Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen ont décrit le premier facteur neurotrophique dans du venin de serpent. Ce facteur possède la capacité d'induire la croissance de fibres nerveuses dans le ganglion sensoriel d'embryons de poulets, effet biologique similaire à celui induit par l'implantation d'un sarcome de souris dans des embryons de poulets. Ils démontrèrent ainsi la présence de facteurs solubles produits par la tumeur et jouant un rôle important dans l'innervation des cellules neuronales [24-27]. Pendant le développement, les cellules neuronales produisent des facteurs solubles qui agissent sur leurs cibles, permettant ainsi leur survie et leur croissance, que ces deux auteurs nommèrent *Nerve Growth Factor*. En 1954, le *Nerve Growth Factor* (NGF) est la première neurotrophine à être isolée [24-27]. Cette découverte a valu à leurs deux auteurs le prix Nobel de Physiologie en 1986 [28].

Le Brain-Derived Neurotrophic Factor BDNF est ensuite isolé et purifié par la même équipe, à partir de tissus provenant de cerveau de porc [29]. La Neurotrophine-3 (NT-3) a été découverte en 1990, au cours d'analyses comparatives des séquences du NGF et du BDNF [30-32], puis Finn Hallbook et ses collaborateurs ont isolé un autre membre de la famille des neurotrophines chez le xénope ayant 50 à 60% d'homologie avec le NGF, la Neurotrophine-4 (NT-4) [33] ; dans la même période, Lucy Berkemeier et son équipe ont identifié la Neurotrophine-5 (NT-5) chez l'Homme [34]. L'analyse phylogénique a montré que ces deux neurotrophines étaient orthologues et elles ont donc été nommées neurotrophin-4/5 (NT-4/5) chez les mammifères. D'autres orthologues des neurotrophines ont par la suite été découverts chez des animaux moins développés, comme la Neurotrophine-6 (NT-6) et la Neurotrophine-7 (NT-7) chez les poissons [35, 36].

Les gènes des neurotrophines sont bien conservés au cours de l'évolution et dérivent d'un même gène ancestral commun [37]. Les gènes du NGF, BDNF, NT-3 et de la NT-4/5 sont paralogues. Chez l'Homme, ils sont localisés respectivement sur les chromosomes 1p13.3, 11p13, 12p13 et 19q13.3 (**Figure 1**).

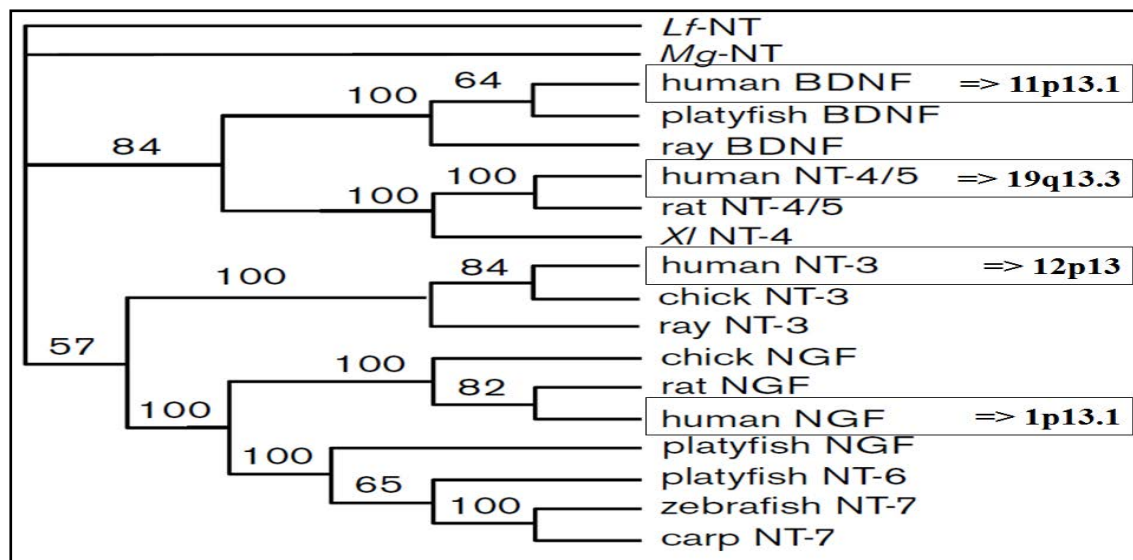


Figure 1: Illustration schématique de l'évolution des neurotrophines basée sur les séquences en acides aminés, chez différentes espèces (d'après Hallböök et al. 1999 [37]).

Les neurotrophines sont exprimées au cours des stades précoces du développement embryonnaire et jouent un rôle crucial dans la neurogenèse au niveau du système nerveux central et périphérique [38]. Afin de définir leurs fonctions respectives, leur inactivation a été réalisée dans différents modèles animaux. Ainsi, les animaux BDNF^{-/-} et NT-3^{-/-} ne présentent pas d'anomalie majeure du développement du système neurosensoriel [39, 40]. Cependant, le traitement de rats nouveaux nés par des anticorps bloquants anti-NT-3 induit une perte substantielle d'oligodendrocytes au niveau du nerf optique, suggérant que cette neurotrophine joue un rôle important dans la différenciation de leurs précurseurs [41].

Le traitement par du NGF, dans un modèle lésionnel du système nerveux central, permet de prévenir la mort cellulaire neuronale [42-44]. Les souris NGF^{-/-} présentent des défaillances importantes de neurones des systèmes sympathique et sensoriel à la période périnatale, mais un phénotype relativement normal du système cholinergique [45].

Ainsi, les neurotrophines sont des facteurs de croissance initialement découverts dans le système nerveux, ayant pour fonction de contrôler la croissance, la prolifération et la survie des cellules neuronales et gliales [2, 3, 46].

2. Biogenèse des neurotrophines:

Toutes les neurotrophines sont synthétisées en suivant le même processus de maturation. La transcription puis la traduction du gène des neurotrophines donne une protéine précurseur (pré-pro-protéine) de 31 à 35 KDa (240 à 260 acides aminés) (Figure 2). Cette protéine est composée d'un peptide signal, permettant sa séquestration dans le réticulum endoplasmique. Le clivage du peptide signal donne lieu à la formation de pro-protéines, les Pro-Neurotrophines (Pro-NT). Celles-ci peuvent dimériser de façon non covalente, par des ponts disulfures grâce à la présence de résidus cystéine conservés dans toutes les neurotrophines [47-49]. Ces protéines sont ensuite distribuées dans le réseau trans-golgien (*Trans-Golgi Network*, TGN) et peuvent être clivées au niveau de sites spécifiques, soit au niveau du TGN sous l'action des protéases intracellulaires, des furines et des pro-convertases (PC) (e.g : PC1/3, PC2, PC4, PC5/6, PC7, PACE4, Paired Basic Amino Acid Cleaving Enzyme 4) [51, 52], soit au niveau des vésicules de sécrétion ou dans le milieu extracellulaire sous l'effet de la plasmine ou de certaines métalloprotéases (MMP-3, MMP-9) [53, 54].

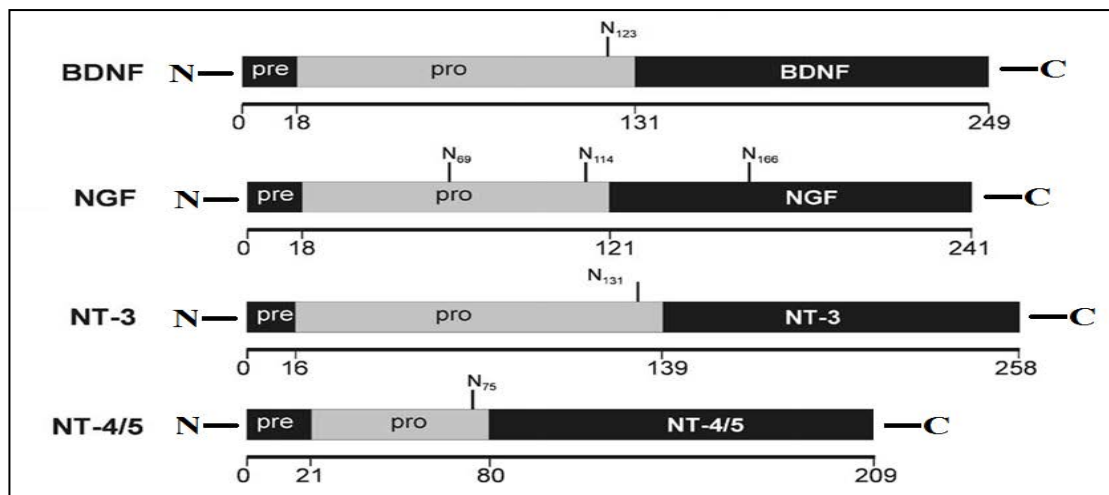


Figure 2 : illustration schématique de la structure primaire des neurotrophines (d'après Lessmann et al. 2003 [48]).

Le peptide signal du côté N-terminal de la protéine (pre) est clivé au niveau du réticulum endoplasmique (RE) ; la partie progénitrice (pro) possédant un ou plusieurs sites de N-Glycosylation potentiels est clivée par des protéases spécifiques à différents niveaux, au niveau du réseau trans-golgien, au niveau des vésicules de sécrétion ou au niveau extracellulaire, donnant naissance au peptide mature (neurotrophine mature) localisé dans la région C-terminale.

3. Les récepteurs aux neurotrophines :

Les neurotrophines exercent leurs fonctions biologiques par la fixation à plusieurs types de récepteurs membranaires composés du récepteur *p75 neurotrophin receptor* ($p75^{NTR}$) qui fait partie de la superfamille des récepteurs au TNF (*Tumor Necrosis Factor Receptor*, TNF-R) et d'une famille de récepteur à domaine tyrosine kinase : les Trks (*Tropomyosin-related kinases*). La dénomination Trk est issue des travaux de l'équipe de Mariano Barbacid qui, en étudiant les processus oncogéniques, a identifié quatre protéines oncogéniques, notées « *oncA*, *oncB*, *oncC* et *oncD* ». Les 3 premières ont été identifiées comme étant les oncogènes cellulaires « Ha-ras-1, Ki-ras-2 et Nras », respectivement. Toutefois *oncD* n'avait aucune homologie de séquence avec les membres de la famille des gènes ras. L'analyse de sa séquence a montré que *oncD* était le résultat de réarrangement de deux *loci*, le premier codant pour une tropomyosine et le deuxième pour une protéine à domaine tyrosine kinase. Ce proto-oncogène fut ainsi appelé *Tropomyosin-related kinase* (Trk) [55-57].

Le NGF a ensuite été identifié comme son ligand et ce récepteur a été nommé TrkA [57]. TrkB fut ensuite identifié comme le récepteur du BDNF [58, 59] et de la Neurotrophine-4/5 [60] et TrkC comme le récepteur de la Neurotrophine-3 [61]. Il a été observé que la Neurotrophine-3 peut également interagir avec TrkA et TrkB, en absence de son récepteur spécifique TrkC [62] (**Figure 3**). La Liaison de la NT à son récepteur à haute affinité induit une dimérisation du récepteur Trk, initiant l'activation de la Kinase et la trans-phosphorylation [63].

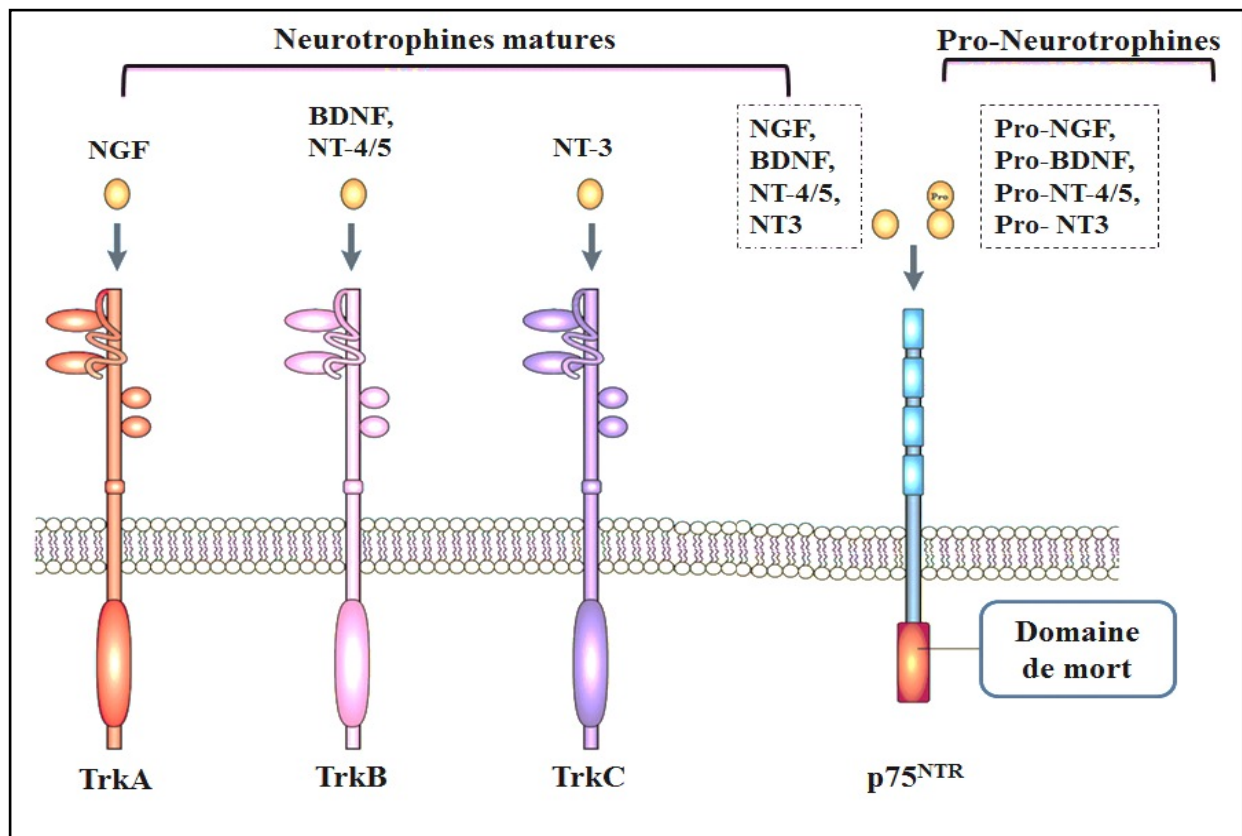


Figure 3 : Illustration schématique des différents récepteurs aux neurotrophines (d'après Chao et al. 2003 [4]). Les Neurotrophines matures se lient à deux types de récepteurs transmembranaires : i) soit de haute affinité aux récepteurs Trk , TrkA fixe le NGF, TrkB le BDNF et la NT4/5, et le récepteur TrkC la NT-3, ii) soit de faible affinité au récepteur p75^{NTR}, P75^{NTR} appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF et possédant une séquence de domaine de mort (Death Domain) dans sa partie intracellulaire. P75^{NTR} est également capable de fixer avec une haute affinité les pro-Neurotrophines (pro-NT).

Les récepteurs Trk sont des récepteurs transmembranaires de type 1 qui possèdent une grande homologie de séquence et dont le poids moléculaire est proche (environ 140KDa). Les données phylogénétiques montrent que tout comme les neurotrophines, les récepteurs Trk dérivent d'un gène ancestral commun [37]. Les gènes des Trk sont également paralogues et sont localisés sur les chromosomes 1q21-22, 9q22.1 et 15q25, pour le TrkA, TrkB et TrkC, respectivement (**Figure 4**).

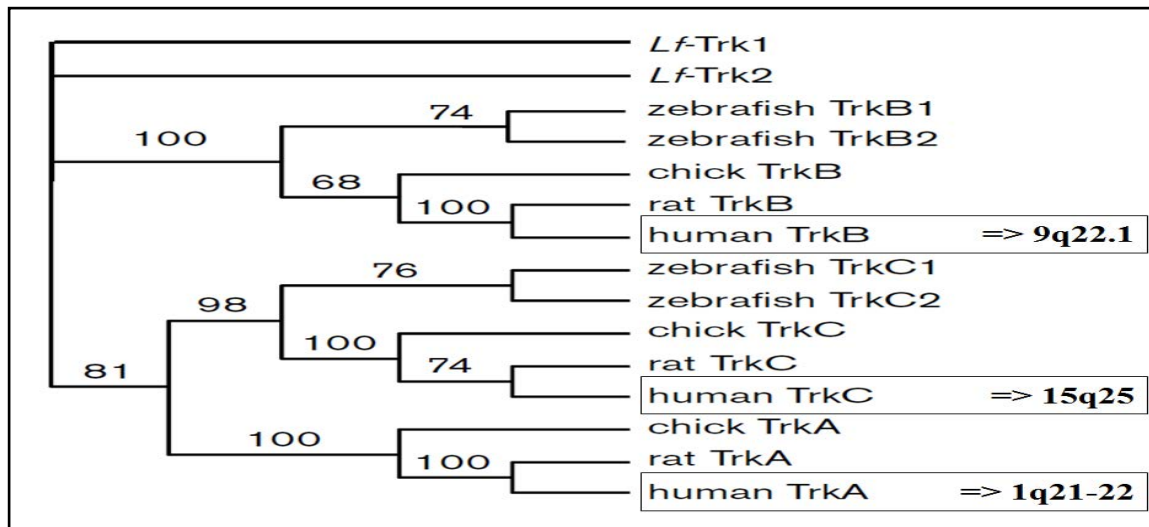


Figure 4 : Illustration schématique de l'évolution des récepteurs Trk basée sur les séquences en acides aminés, chez différentes espèces (d'après Hallböök et al. 1999 [37]).

4. Structure et biologie des récepteurs aux neurotrophines :

4. 1. Les récepteurs Trk (Tropomyosin-related kinase) :

Ce sont des protéines transmembranaires, d'environ 800 acides aminés (~140 kDa). La partie extracellulaire (~ 400 acides aminés) est composée de deux régions riches en Cystéine (les domaines C1 et C2, C : *Cystein Cluster*), entre lesquelles s'insère un domaine riche en Leucine, LRR (*Leucin-Rich Repeat*), suivis de deux domaines immunoglobine Ig-1 et Ig-2 (*Ig-Like Domain*) qui déterminent la spécificité de liaison des récepteurs à leurs ligands respectifs (Figure 5). Cette partie extracellulaire est richement glycosylée, ce qui permet d'une part l'adressage de la protéine aux membranes et d'autre part de prévenir son activation de façon indépendante du ligand [64-66]. Par ailleurs, chez l'Homme, 9 des 13 résidus Cystéine et 4 des 12 sites de N-Glycosylation sont conservés entre TrkA, B et C [67]. La partie intracellulaire est composée d'un domaine riche en tyrosine kinase. Plusieurs de ces sites sont également conservés au cours de l'évolution (10 des 13 résidus Tyrosine entre les trois Trk) [66, 67].

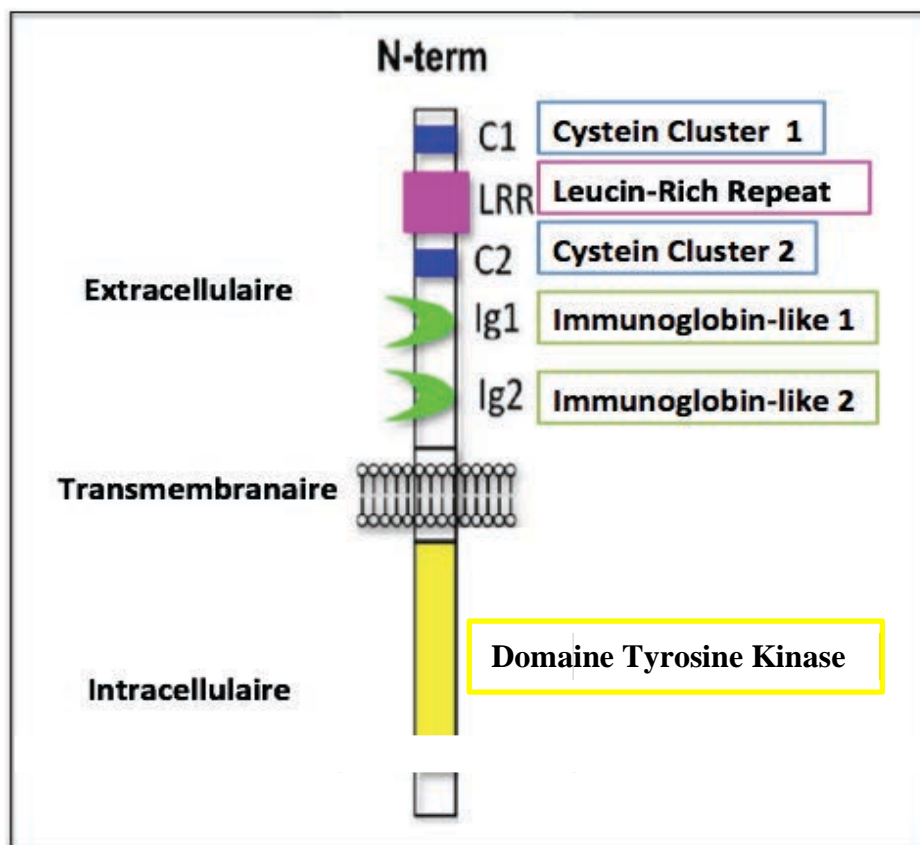


Figure 5 : Illustration schématique de la structure des récepteurs Trk (TrkA, B et C) (d'après Uren et Turnley, 2014).

La partie extracellulaire est composée de deux domaines riches en Cystéines (C1 et C2), d'un domaine riche en Leucine (LRR) et de deux domaines *Immunoglobulin-like* (Ig1 et Ig2). La partie intracellulaire comporte un domaine riche en Tyrosine Kinase. Les deux parties sont séparées par la région transmembranaire.

La séquence et l'activité tyrosine kinase des récepteurs Trk présentent une forte homologie avec celle des autres récepteurs à tyrosine kinase (RTK) [68]. La synthèse des récepteurs Trk est soumise à une régulation dynamique. Chaque gène code pour des transcrits qui peuvent subir différents épissages alternatifs et qui conduisent à la formation de nombreux isoformes de fonctions biologiques diverses [69-71].

L'interaction des neurotrophines avec leurs récepteurs se fait principalement au niveau des domaines « *Ig-Like* » [72, 73]. Toutefois, les travaux de l'équipe de Rainer Schneider ont montré que le domaine riche en Leucine (LRR) des récepteurs Trk peut interagir avec les neurotrophines [74-76]. L'interaction des dimères de

neurotrophines avec leurs récepteurs Trk s'effectue avec une forte affinité de liaison (de l'ordre du picomolaire). Cette interaction induit une homodimérisation du récepteur Trk, initiant l'activation de kinases et une transphosphorylation des résidus kinases des domaines tyrosine kinase intracellulaires des dimères. Il en résulte l'activation de trois voies de signalisation majeures : la voie des MAP-Kinases Mek/Erk, la voie de la PI3 Kinase et la voie de la PLC γ [77-79].

4. 2. Les Isoformes des récepteurs Trks:

4. 2. a. TrkA :

Le gène *TRKA* (appelé également *NTRK1*) contient 19 exons et code pour trois isoformes décrites dans la littérature, notées TrkA-I, TrkA-II et TrkA-III. Les travaux de Barker et de son équipe ont montré que l'épissage alternatif du transcrit de TrkA au niveau de l'exon 9 donnait deux isoformes TrkA-I et TrkA-II. Cette dernière (TrkA-II) contient la séquence de l'exon 9 (18bp) et présente une insertion de 6 acides aminés dans la partie extracellulaire. La présence de cette insertion (TrkA-II) ou son absence (TrkA-I) n'affecte ni la spécificité de liaison, ni la capacité de transduction du signal par l'interaction avec le NGF. Toutefois, elle participe à l'augmentation de la spécificité du récepteur TrkA pour la NT-3, TrkA-I étant incapable de lier la NT-3. TrkA-I a par ailleurs une expression ubiquitaire alors que celle de TrkA-II est préférentiellement neuronale [80-83].

L'isoforme TrkA-III a été découverte secondairement (en 2004) par Tacconelli et son équipe [84]. Son expression est augmentée en condition hypoxique, au détriment des isoformes TrkA-I et -II. C'est un variant plus court, épissé des exons 6, 7 et 9. Il s'agit d'un proto-oncogène dont l'expression est considérée comme de mauvais pronostic en cancérologie. En effet, TrkA-III est capable de s'autophosphoryler indépendamment de sa liaison au ligand et est donc activée de façon constitutive. Cette activation est en faveur d'une signalisation TrkA-III/PI3K/Akt/NFK-B, pro-oncogénique et pro-angiogénique, au dépens d'une signalisation NGF/TrkA/Ras/MAPK anti-oncogénique [82, 84-86]. L'expression de l'isoforme TrkA-III est augmentée en conditions hypoxiques, au détriment de l'expression des deux autres isoformes. Avec une activation constitutive, elle active les voies PI3K/Akt en faveur de la survie cellulaire.

Les souris dont le gène TrkA est inactivé sont viables à la naissance, mais présentent une perte massive de cellules neuronales au niveau des systèmes nerveux sensitif et sympathique et meurent dans le ou les premiers mois de vie [87]. Ce modèle $TrkA^{-/-}$, ainsi que le modèle $NGF^{-/-}$, soulignent l'importance de l'axe NGF/TrkA dans le développement du système nerveux central et périphérique [45, 82, 87].

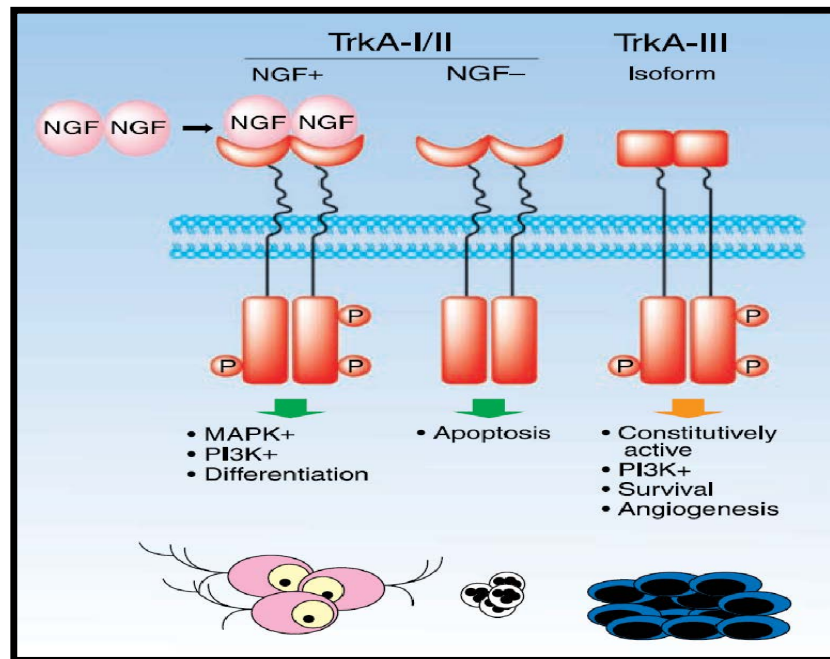


Figure 6 : Illustration des principales isoformes issues de l'épissage alternatif du transcrit du gène de TrkA (NTRK1) (d'après Brodeur et al. 2009 [82]).

4. 2. b. TrkB:

La littérature rapporte la présence plus de 100 isoformes pour TrkB, 10 protéines sont codées et 3 d'entre elles sont dites majoritaires, elles sont notées : TrkB-FL (FL : *Full Length*), TrkB-T1 (T1 : *Truncated 1*) et TrkB-T-shc (T-shc : *Truncated-shc*). Elles sont codées par des transcrits qui sont le résultat d'un épissage alternatif du gène *NTRK2* [88]. Le gène *NTRK2* humain contient 24 exons. TrkB-FL est épissé des exons 16 et 19 et code pour une protéine d'environ 145 kDa. Elle comporte les 3 parties des récepteurs Trks (extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire)[88, 89].

TrkB-T1 est l'isoforme la plus courte ; son codant stop est localisé sur l'exon 16 et code pour une protéine d'environ 95 kDa. Elle est dépourvue de la partie

intracellulaire et donc de domaine tyrosine kinase. Toutefois, sa partie transmembranaire et extracellulaire et donc sa capacité de liaison de ligands (BDNF et NT-4/5) sont préservées. Son expression est ubiquitaire et prédominante dans les tissus neuronaux et non neuronaux [88-92]. Le BDNF peut induire une signalisation intracellulaire de TrkB-T1, caractérisée par une augmentation de la pénétration du calcium. TrkB-T1 peut également être associé à GDI-1 (*Rho-GDP Dissociation Inhibitor-1*), complexe qui régule l'activité des Rho-GTPases et par conséquent régule la morphologie des cellules, notamment astrocytaires. L'expression de TrkB-T1 est régulée de façon importante lors du développement du système nerveux, la mort et la survie cellulaire, le remodelage axonal, le développement du système visuel ainsi que la migration cellulaire. [93-95]

Au niveau des cellules neuronales, TrkB-FL augmente la ramification proximale dendritique des neurones alors que TrkB-T1 favorise leur allongement distal [96]. La fonction de cette isoforme n'est pas totalement élucidée, toutefois plusieurs travaux soutiennent l'hypothèse de son rôle de dominant négatif au niveau neuronal. TrkB-T1 jouerait ainsi un rôle de compétiteur pour le BDNF, empêchant sa fixation à TrkB-FL. TrkB-T1 exerce également une fonction inhibitrice de l'autophosphorylation de TrkB-FL, par la formation de dimères TrkB-FL/TrkB-T1 incapables de s'autophosphoryler [78, 97-99].

TrkB-T-shc est épissé pour l'exon 16, mais son codant stop est localisé sur l'exon 19. Il code également pour une protéine tronquée dans sa partie intracellulaire d'environ 95 KDa. Mais contrairement au TrkB-T1, TrkB-T-shc possède une courte partie intracellulaire, qui est le domaine de liaison aux protéines shc. Son expression a surtout été décrite dans le système nerveux central [88, 89].

Tout comme le modèle de souris TrkA^{-/-}, les souris TrkB^{-/-} arrivent au terme du développement embryonnaire mais ne survivent que quelques semaines. Les déficits affectent le système nerveux central et périphérique (neurones sensitifs, nerf facial et neurones moteurs de la moelle épinière) [82, 100].

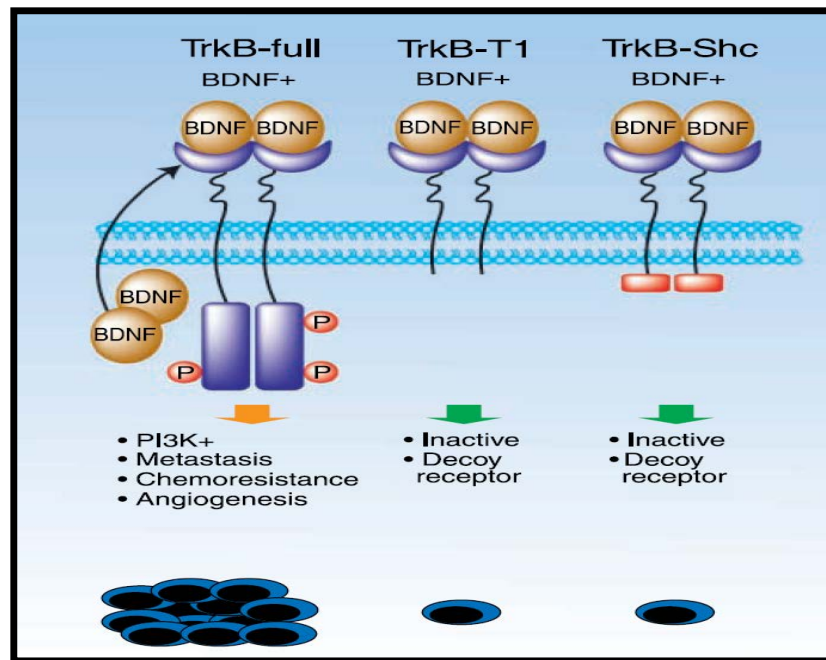


Figure 7 : Illustration des principales isoformes issues de l'épissage alternatif du transcrit du gène de TrkB (NTRK2) (d'après Brodeur et al. 2009 [82]).

L'isoforme totale TrkB-FL (*Full Length*) est l'isoforme la plus longue conférant au récepteur une partie extracellulaire et une partie intracellulaire à domaine tyrosine kinase, capable d'activer une signalisation après la dimérisation du récepteur et la phosphorylation du domaine tyrosine kinase. A l'inverse, les formes tronquées TrkB-T1 et TrkB-shc, dépourvues du domaine tyrosine kinase, induisent une activation cellulaire dont les mécanismes restent incertains selon les types cellulaires. Ainsi, TrkB-shc possède un site de liaison « shc » capable d'être phosphorylé, et TrkB-T1 induit une activation intracellulaire dans des astrocytes qui dépend de l'activation de protéines G [93].

4. 2. c. TrkC :

Plusieurs isoformes sont également répertoriées pour TrkC. Des épissages alternatifs donnant naissance à une dizaine d'isoformes. Des séquences d'insertion sont également décrites au niveau du domaine catalytique. Une insertion de 14 acides aminés au niveau du domaine tyrosine kinase est observée. Cette insertion pourrait modifier la spécificité de ce domaine pour le substrat, pouvant ainsi altérer son activité et donc la réponse cellulaire. Une insertion au niveau du domaine transmembranaire de 9 acides aminés est également décrite par McGregor et son

équipe. Elle a la même localisation que celle décrite par Barker sur TrkA au niveau du second domaine immunoglobine (Ig2) [72].

Chez l'Homme, il existe au moins 4 isoformes de TrkC, dépourvues de la partie intracellulaire, mais l'isoforme prédominante reste le TrkC-T1. Sa fonction serait similaire à celle de l'isoforme tronquée de TrkB (TrkB-T1) : TrkC-T1 jouerait le rôle de dominant négatif, leurrant la fixation du ligand NT-3 sur le récepteur TrkC-FL, inhibant ainsi son activation [72, 101-106].

Les souris $\text{TrkC}^{-/-}$ présentent des anomalies affectant le système nerveux périphérique, consécutives à la disparition des neurones myélinisés spinaux et à l'atteinte des ganglions rachidiens postérieurs [107]. Les différentes analyses des modèles $\text{NT-3}^{-/-}$ $\text{TrkC}^{-/-}$ ont montré l'importance de l'axe NT-3/TrkC dans la survie et la prolifération des précurseurs neuronaux impliqués dans le contrôle de la proprioception [107-111].

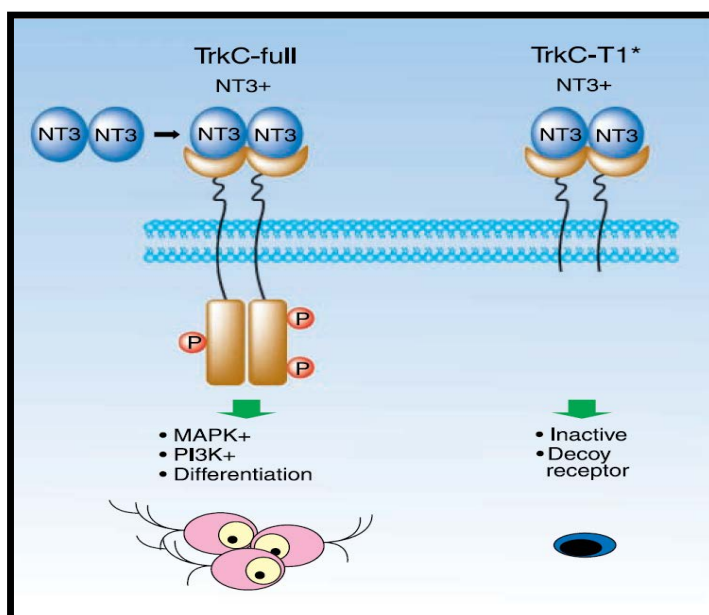


Figure 8 : Illustration des principales isoformes issues de l'épissage alternatif du transcrit du gène de TrkC (*NTRK3*) (d'après Brodeur et al. 2009 [82]). La forme complète TrkC-FL possède une partie intracellulaire dotée d'un domaine Tyrosine Kinase, capable d'activer les voies PI3K en faveur de la survie et de la différenciation cellulaire. Plusieurs isoformes tronquées sont connues ; l'isoforme TrkC-T1 reste la forme majoritaire, tronquée de sa partie intracellulaire contenant le domaine Tyrosine Kinase, et jouerait un rôle de dominant négatif. (* : Isoforme majoritaire des TrkC tronqués).

4. 3. Le récepteur p75^{NTR} :

4. 3. a. Structure de la protéine p75^{NTR} :

Le récepteur p75^{NTR} fut décrit pour la première fois en 1973 par Herrup et Shooter, comme étant un récepteur au β -Nerve Growth factor (β -NGF) appelé également NGF-R (*NGF-Receptor*) [112]. Mais il n'a été cloné qu'en 1986 [113, 114]. Par la suite, les analyses faites après la découverte des autres membres des neurotrophines ont montré que le récepteur p75^{NTR} était capable de lier toutes les neurotrophines, le BDNF [115] et la NT-3 [116] [59] avec la même affinité (10-9M) et dans tous les types cellulaires. Par ailleurs, il peut lier les pro-neurotrophines avec une plus haute affinité [53, 117]. Chez l'Homme, le gène de ce récepteur est localisé sur le chromosome 17 (17q12-q22) [118, 119].

Le récepteur p75^{NTR} est un membre de la superfamille des TNF-R (*Tumor Necrosis Factor – Receptor*) [120]. Il possède un peptide signal de 28 acides aminés qui, après clivage donne une protéine composée d'une partie extracellulaire d'environ 222 acides aminés, d'une partie transmembranaire faite d'une vingtaine d'acides aminés et d'une partie intracellulaire de 155 acides aminés

La partie extracellulaire est composée de 4 domaines riches en Cystéines CDR-1, -2, 3-, et -4 (CRD : *Cystein Rich Domain*). Ce sont des domaines chargés négativement et qui constituent les sites de fixation des neurotrophines matures et des pro-neurotrophines. Au niveau de cette partie extracellulaire plusieurs sites de N- et de O-glycosylation sont répertoriés, ce qui donne lieu à une protéine de 75 kDa [112, 113].

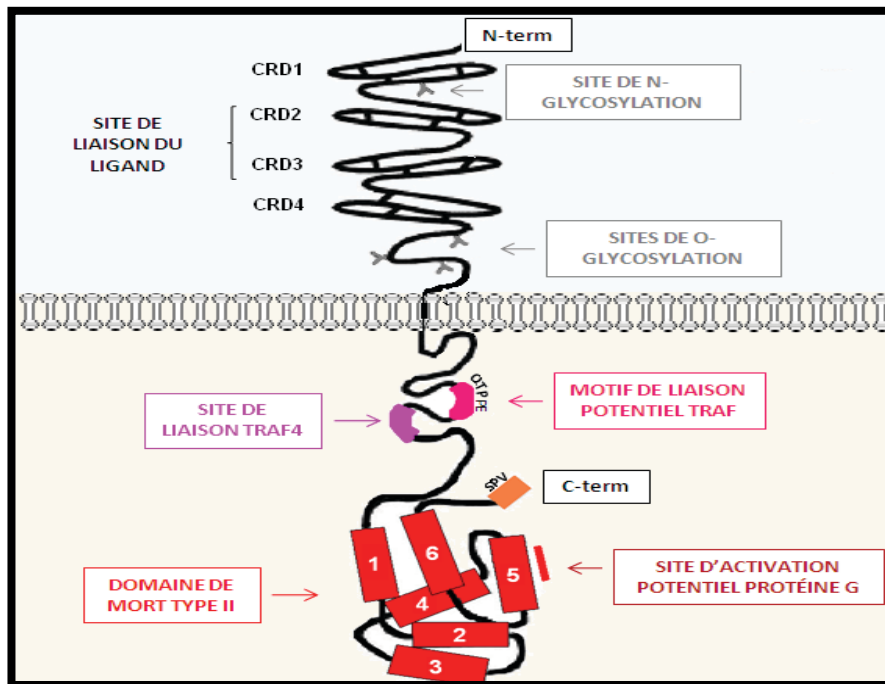


Figure 9 : Illustration schématique de la structure du récepteur P75^{NTR} (d'après Roux et Barker, 2002 [113])

La partie extracellulaire est composée de 4 domaines riches en cystéines (CRD : *Cystein Rich Domain*) permettant la liaison des neurotrophines matures et des pro-neurotrophines, comportant plusieurs sites de O- et de N- glycosylation. La partie intracellulaire comporte un domaine de mort de type II (DD : *Death Domain*), 2 sites d'interaction avec des protéines adaptatrices TRAF (*TNFR-Associated Factor*), ainsi qu'un domaine d'activation des protéines-G.

Cette protéine contient également un domaine de mort (*DD : Death Domain*) de type II. La partie intracellulaire ne possède pas d'activité catalytique, elle est formée d'une structure composée de 6 hélices α . Les hélices 1, 2 et 5 permettent le recrutement des protéines adaptatrices : NADE (*p75^{NTR}-Associated Cell death Executor*) [114], RIP-2 (*Receptor Interacting Protein-2*) [115] et RhoA (*Ras-homology gene family, membre A*) [116], permettant la transduction du signal [113, 117].

4. 3. b. Les isoformes de p75^{NTR} :

Le gène de p75^{NTR} est composé de 6 exons. La traduction du transcrit complet donne l'isoforme p75^{NTR} complet (P75^{NTR}-FL). Cette isoforme est exprimée dans de nombreuses populations cellulaires notamment au niveau du système nerveux. Son expression est associée au développement et la différenciation de plusieurs compartiments du système nerveux central et périphérique, mais p75^{NTR}-FL est également exprimé dans des tissus non neuronaux [113].

Plusieurs isoformes de p75^{NTR} sont issues à la fois d'un épissage alternatif du transcrit du gène de p75^{NTR} mais aussi de la maturation de cette protéine par protéolyse.

L'épissage de l'exon 3 du transcrit du gène de p75^{NTR} donne une isoforme dépourvue des trois domaines riches en Cystéines CDR-2, -3 et -4. Cette isoforme ne peut donc pas lier les neurotrophines. Toutefois, le domaine CDR-1, la partie transmembranaire ainsi que la partie intracellulaire restent présentes. C'est l'isoforme la plus courte d'où son nom s-p75^{NTR} (*short p75^{NTR}*), dont la fonction reste à élucider [118].

La protéine p75^{NTR} (p75^{NTR}-FL) n'est pas la forme définitive, puisque cette dernière peut également subir un clivage par des protéases spécifiques (ADAM10 et 17) (ADAM : *A Disintegrin And Metalloprotease*), libérant un fragment peptidique libre (soluble) à partir de la partie extracellulaire. Ce fragment est constitué des quatre domaines riches en Cystéine (CRD) et noté p75^{NTR}-ECD (ECD : *Extra Cellular Domain*), celui-ci conserve sa capacité à fixer les neurotrophines [119]. Le fragment localisé du côté intracellulaire (C-terminal), noté p75^{NTR}-CTF (*C-Terminal Fragment*) peut subir un clivage supplémentaire par des γ -sécrétases. Celles-ci peuvent intervenir au niveau de la partie intracellulaire et générer un fragment de 20 kDa, noté p75^{NTR}-ICD (ICD : *Intra Cellular Domain*). Ce fragment conserve sa capacité de signalisation intracellulaire [120-122] (**Figure10**).

Podlesnyi et son équipe ont démontré que le fragment p75^{NTR}-ICD pouvait être transloqué dans le noyau, suite à une stimulation par du pro-NGF induisant l'apoptose de la cellule. L'inhibition des γ -sécrétases bloque la translocation nucléaire de ce fragment et inhiberait ainsi l'apoptose [123]. Le fragment p75^{NTR}-ICD peut également amplifier la réponse cellulaire liée à la liaison NGF / TrkA sans des modèles neuronaux [124].

4. 4. Les voies de signalisations du récepteur p75^{NTR} :

p75^{NTR} peut également interagir avec une protéine adaptatrice TRAF-6, activateur des facteurs de transcription NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*) et JNK (*c-Jun N-Terminal Kinase*) [125]. TRAF-6 peut également activer le facteur NRIF (*Nuclear Receptor-Interacting Factor*), essentiel à la mort cellulaire induite par p75^{NTR} notamment au niveau des cellules neuronales [121, 126-130]. Salehi et son équipe, ont démontré que la protéine adaptatrice NRAGE (*Neurotrophin Receptor-interacting MAGE-homolog*), qui appartient à la famille MAGE (*Melanoma-Associated Antigen*) est capable d'interagir avec p75^{NTR} au niveau du domaine juxta-membranaire et induit l'activation du Cytochrome-C et des caspases associées à la voie apoptotique mitochondriale [131]. Cette interaction est également impliquée dans le blocage du cycle cellulaire. Cette interaction avec NRAGE est caractérisée par un effet pro-apoptotique de p75^{NTR} [131-133].

La liaison de p75^{NTR} au NGF induit le recrutement d'une protéine adaptatrice SC-1 (*Schwann-Cell Factor-1*), induisant sa translocation dans le noyau [134]. Cette interaction induit également l'arrêt du cycle cellulaire et favorise l'effet pro-apoptotique de p75^{NTR} [133, 135].

En plus des protéines NRAGE et SC-1, d'autres protéines adaptatrices peuvent être recrutées et associées au récepteur p75^{NTR}. La protéine adaptatrice NADE (*p75^{NTR} Associated Death Executor*) interagit avec p75^{NTR} et participe à la mort cellulaire induite par la liaison avec son ligand NGF par la voie des caspases [136]. Les travaux des équipes de Sato, de Mukai et collaborateurs ont montré que cette voie de mort nécessite également l'interaction d'une protéine chaperonne adaptatrice, la 14-3-3 ϵ [113, 136-139].

Paradoxalement, Provenzano et son équipe ont montré que le clivage de p75^{NTR} puis la translocation du fragment p75^{NTR}-ICD dans le noyau sont également associés à l'entrée de la cellule dans les phases du cycle cellulaire et donc inducteurs de la prolifération cellulaire [140].

En fonction du contexte cellulaire, l'activation du récepteur p75^{NTR} par les neurotrophines peut favoriser des voies de signalisation de survie ou de mort cellulaire. Ainsi, dans les cellules Schwann la liaison du NGF au récepteur p75^{NTR} active un message de survie cellulaire *via* l'activation du facteur de transcription NF- κ B [141]. Cette voie de signalisation nécessite le recrutement de protéines

adaptatrices différentes de celles qui interviennent dans les signaux de mort cellulaires induits par p75^{NTR}. La protéine RIP-2 (*Receptor-Interacting Protein-2*) est une Sérine/Thréonine Kinase qui est capable de se fixer au domaine de mort de p75^{NTR}, grâce à son domaine CARD (*Caspase Recruitment Domain*) et d'activer par conséquent le facteur de transcription NF-κB, garant d'un signal de survie cellulaire [115]. L'activation de NF-κB requière le recrutement d'autres protéines adaptatrices, notamment en condition de stress cellulaire (privation sérique, hypothermie...) [142, 143].

p75^{NTR} peut également recruter la protéine IRAK-1 (*Interleukin-1 Receptor Associated Kinase-1*), une autre kinase qui peut se fixer directement au récepteur p75^{NTR}, activant en aval le facteur de transcription NF-κB. Cette voie nécessite l'activation de la kinase PKC (Protein Kinase C) et le recrutement de la protéine adaptatrice p62. Par ailleurs, TRAF-6 interagit également avec cette protéine adaptatrice p62 et active le facteur de transcription NF-κB, en faveur de la survie cellulaire [144-146].

Une autre voie de signalisation, inhibitrice de l'élongation axonale, est modulée par le récepteur p75^{NTR} au niveau des neurones du système nerveux central. Elle dépend d'une Rho-GTPase (*Ras-like Protein Guanosine Tri-Phosphatase*), RhoA, qui module la croissance et le développement axonal selon la liaison de neurotrophines à p75^{NTR}. Ainsi, en absence de la fixation des neurotrophines, RhoA est maintenue en état d'activation et inhibe la croissance neuritique. La liaison du ligand déplace la liaison de RhoA au récepteur p75^{NTR} et donc supprime l'inhibition, permettant ainsi le remodelage du cytosquelette et le développement axonal [116, 147].

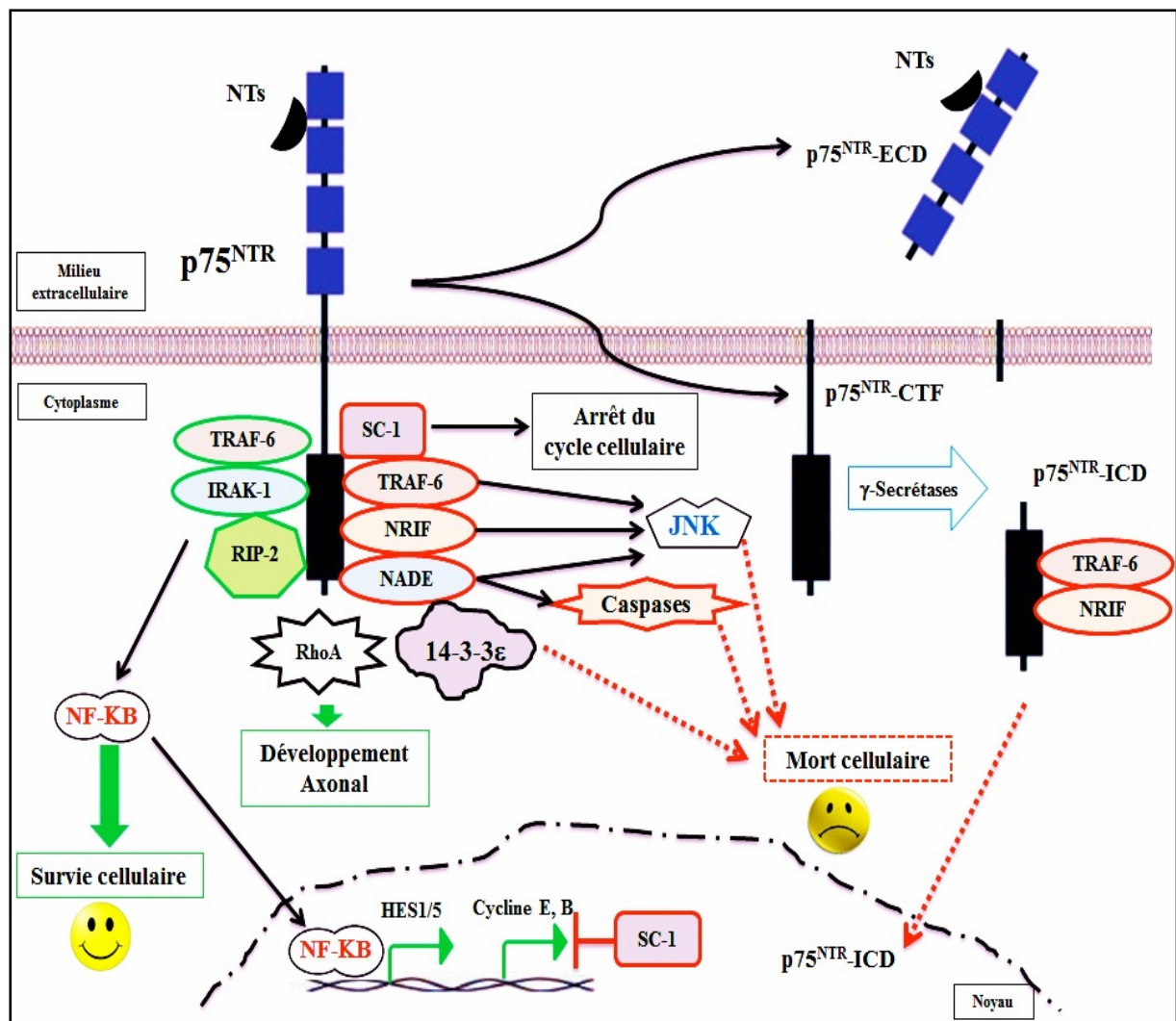


Figure 10: Illustration schématique des voies de signalisation activées par le récepteur $p75^{NTR}$, au travers des différentes protéines adaptatrices (d'après Arévalo et Wu, 2006 et Kenchappa et al. 2010 [119, 122]).

L'activation du récepteur $p75^{NTR}$ par sa liaison à un ligand (NT ou pro-NT) entraîne le recrutement de différentes protéines adaptatrices. Des complexes protéiques se forment et activent principalement deux voies de signalisation conduisant (i) soit à la mort cellulaire et à l'arrêt du cycle cellulaire, notamment par l'activation de la voie des JNK et des caspases, (ii) soit à une voie de survie et de prolifération cellulaire, par l'activation du facteur de transcription de survie NF- κ B. Le clivage de $p75^{NTR}$ par des métalloprotéases et par des α - et γ - sécrétases entraîne sa translocation dans le noyau, induisant une mort cellulaire.

4. 5. Les corécepteurs de p75^{NTR} :

Le récepteur p75^{NTR} peut également moduler d'autres fonctions biologiques grâce à son association à des « récepteurs-partenaires », il peut lier des ligands différents avec des affinités variables. Plusieurs de ces corécepteurs ont été identifiés:

4. 5. a. Nogo et LINGO-1:

Le récepteur p75^{NTR} peut également agir sur la modulation et l'activité du cytosquelette *via* la régulation de la voie Rho. Ce mécanisme est observé au niveau du système nerveux central où l'élongation de la croissance axonale est inhibée, après lésion, par des protéines associées à la myéline se fixant à des co-récepteurs de p75^{NTR}. Ainsi, au niveau de la partie intracellulaire, la fixation de Rho-GDI (*Rho-GDP Dissociation Inhibitor*) est inhibitrice de l'élongation et la croissance neuronale. Cette inhibition est contrôlée par l'association de p75^{NTR} à d'autres acteurs, le récepteur Nogo-R, appelé également RTN4R (*Reticulon 4 Receptor*) et la protéine transmembranaire Lingo-1 (*LRR and Ig-domain-containing Nogo-receptor interacting protein-1*). La liaison du MAG (*Myelin-Associated Glycoprotein*), OMgp (*Myelin Oligodendrocyte glycoprotein*) ou de Nogo induit le recrutement de Rho-GDI par le récepteur p75^{NTR}, modulant le remodelage du cytosquelette et donc la croissance neuronale [119, 147-149].

4. 5. b. Les hétéro-dimères p75^{NTR} -Trk :

Le récepteur p75^{NTR} et les récepteurs Trk partagent leurs capacités à lier les neurotrophines, ces 2 types de récepteurs ayant été longtemps discriminés par leurs affinités à lier les neurotrophines, notamment le NGF. Les analyses plus approfondies ont démontré que l'affinité de p75^{NTR} au NGF était équivalente à celle des récepteurs Trk (avec un K_d d'environ 1 à 10 nM) [150]. Ainsi, la co-expression des deux récepteurs augmente l'affinité et la spécificité des récepteurs Trk à leurs ligands neurotrophiques respectifs.

4. 5. c. p75^{NTR} et la sortiline:

Un autre partenaire du récepteur p75^{NTR} est répertorié : la sortiline, appelée également NTSR3 (*Neurotensin Receptor-3*). La sortiline est une protéine-récepteur transmembranaire à domaine VPS10-D (*Vacuolar Protein Sortig-10 Domain*) de répartition majoritairement intracellulaire (environ 90%) [151, 152]. L'une de ses principales fonctions est le transport de neurotrophines : elle est capable en effet de lier et de transporter les neurotrophines matures mais aussi les pro-neurotrophines [53, 153].

Les signaux induits par les neurotrophines *via* les complexes p75^{NTR}/Trk étant activateurs des voies de survie, de différenciation et de prolifération cellulaire, se posait la question des voies induisant la mort cellulaire par l'activation du p75^{NTR}. La capacité de son association à la sortiline répondait en partie à cette question. En effet la sortiline peut être co-exprimée avec le récepteur p75^{NTR}, et est également capable de lier les neurotrophines sous leurs formes matures et immatures. En tant que co-récepteur de p75^{NTR}, elle permet l'induction d'un signal de mort *via* p75^{NTR}, dépendant de la liaison des pro-neurotrophines. Les souris KO-sortiline sont insensibles à l'action pro-apoptotique des pro-neurotrophines [9, 154-156]. De plus, les neurones dans le modèle de KO sortiline présentent des défauts d'apoptose induites par les pro-neurotrophines [154, 155]. Ces données soulignent la fonction clé de la sortiline dans l'orientation vers les voies de survie ou de mort cellulaire, dans la régulation de l'homéostasie cellulaire dépendante des neurotrophines (selon leurs formes matures ou immatures).

Les voies de signalisation intracellulaires mises en jeu par la liaison des pro-neurotrophines à l'hétérodimère p75^{NTR}/sortiline mettent en jeu la phosphorylation de JNK (c-Jun N-terminal Kinase), puis secondairement, le clivage des caspases-9, -6 et -3. Des γ -sécrétases peuvent également cliver la partie intracellulaire de p75^{NTR} et libérer le fragment intracellulaire (p75-ICD) et entraîner la translocation nucléaire du facteur NRIF conduisant à l'apoptose [10, 128, 157].

Il est ainsi admis que les pro-neurotrophines induisent la mort des cellules neuronales *via* l'activation du complexe sortiline/p75^{NTR}, et que l'activation de ce complexe pourrait avoir une implication dans les maladies neuro-dégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer [158-160], l'encéphalopathie spongiforme [161] et la maladie de Parkinson [162]. Les travaux de Al-Shawi et son équipe ont démontré,

à l'aide d'un modèle murin, que le proNGF, par le biais du complexe hétérométrique sortiline/p75^{NTR}, était également impliqué dans la mort de cellules neuronales liée à la sénescence [163, 164]. Le pro-NGF et la sortiline sont également augmentés dans certaines aires du système nerveux central (cortex frontal, noyaux accumbens, amygdale, mésencéphale, cervelet et hypothalamus) en fonction de l'âge [158]. La sortiline peut également participer au transport rétrograde des récepteurs Trks dans les axones [165].

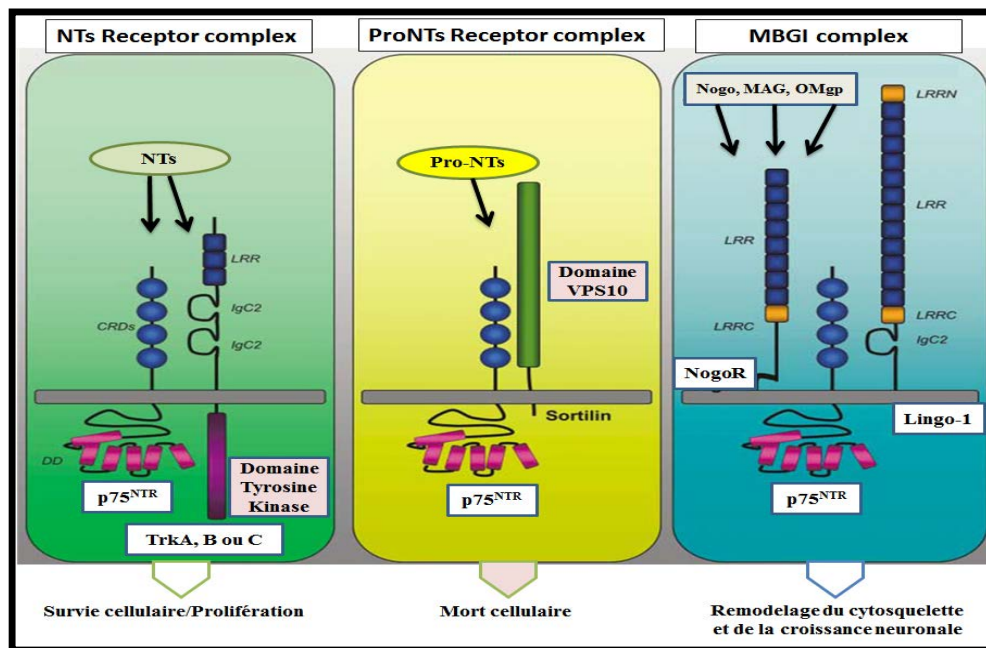


Figure 11 : Illustration des différents co-récepteurs de p75^{NTR} et des conséquences de leur activation selon leurs ligands (d'après Barker. 2004 [149]). p75^{NTR} interagit avec les récepteurs Trk (TrkA, TrkB et TrkC) et augmente l'affinité et la spécificité du récepteur Trk à sa neurotrophine préférentielle, formant un complexe de récepteurs aux neurotrophines « *NTs Receptor complex* ». La liaison de la NT au récepteur Trk induit l'activation du domaine Tyrosine Kinase et l'activation d'un signal de survie et de prolifération cellulaire. La sortiline est capable de lier les neurotrophines sous leur forme immature (Pro-NT), formant un complexe de récepteurs aux pro-neurotrophines « *Pro-NT Receptor Complex* », grâce à la présence d'un domaine VPS10 (*Vacuolar protein sorting 10*). L'hétérodimérisation de p75^{NTR} avec la sortiline conduit à un signal délivré par l'interaction d'une pro-neurotrophine avec la sortiline, induisant un signal de mort cellulaire médié par le domaine de mort de p75^{NTR}. Finalement, p75^{NTR} peut également former un complexe MBGI « *MBGI-Complex* » (*Myelin-Based Growth Inhibitors Complex*) avec les récepteurs Nogo et Lingo-1. En réponse aux ligands Nogo, MAG et OMgp, on observe un recrutement de la Rho-GDI inhibitrice du remodelage du cytosquelette et de la croissance neuronale.

5. Neurotrophines et système immunitaire:

Grâce aux analyses de Hans Selye, il est admis, depuis les années 70, l'existence d'interactions entre les systèmes nerveux et immunitaire [166]. Notamment l'impact du stress sur la modulation de la réponse immunitaire et la capacité à résister à des pathogènes et à développer des pathologies dysimmunitaires ont été observés [166].

Par ailleurs, l'implication des neurotrophines dans la régulation du système immunitaire a été initialement décrite par Luigi Aloe et Rita Levi-Montalcini, démontrant l'effet du NGF sur l'activation et l'infiltration de cellules mastocytaires de rats nouveaux nés [167]. Une dizaine d'années plus tard, il était démontré que les mastocytes produisent et sécrètent du NGF [168].

Ces données ont ensuite été étayées par de nombreuses publications démontrant l'implication des neurotrophines dans la maturation, l'activation et la survie de nombreuses cellules impliquées dans les réponses immunitaires.

5. 1. Les neurotrophines dans les organes hématopoïétiques

Les travaux réalisés sur le développement de l'embryon de poulet par Rita-Levi Montalcini et ses collègues ont été les premiers à démontrer l'expression et l'implication des neurotrophines dans le développement du système immunitaire, notamment chez le poulet. En l'occurrence, ils ont mis en évidence le rôle du NGF dans le développement et la survie des cellules lymphocytaires au niveau de la bourse de Fabricius. D'autre part, les transcrits des neurotrophines (NGF, BDNF et NT-3) ainsi que ceux des récepteurs aux neurotrophines ($p75^{\text{NTR}}$, TrkA, TrkB, et TrkC) sont présents au niveau des rates de poulets, suggérant la même fonction des neurotrophines sur les splénocytes [169-171]. Chez les rats, les neurotrophines sont également présentes au niveau de la moelle osseuse (NGF, BDNF, NT-3 et NT-4/5,) ainsi que toutes les isoformes des récepteurs TrkB, TrkC et TrkA, hormis l'isoforme TrkA-II. Leurs expressions au niveau transcriptionnel sont plus importantes chez le *foetus* que chez l'adulte, suggérant que les NT jouent un rôle dans la maturation des cellules immunitaires [172].

Plusieurs travaux ont montré l'implication des NT et de leurs récepteurs dans le développement des progéniteurs hématopoïétiques :

L'homéostasie des progéniteurs érythrocytaires est soumise à une influence des neurotrophines, puisque les cellules stromales médullaires peuvent produire du NGF qui agit sur les progéniteurs érythrocytaires et participe ainsi à l'effet anti-apoptotique induit par le SCF (Stem Cell Factor) [173].

Le BDNF, produit par les cellules stromales médullaires est également indispensable au développement et à la maturation lymphocytaire B. En effet, les souris inactivées pour le gène du BDNF ont une maturation lymphocytaire B bloquée au stade pré-BII. Ce blocage de maturation est indépendant de l'IL-7, principale cytokine impliquée dans cette étape de maturation et produite par les cellules stromales médullaires [174].

Garcia-Suarez et ses collègues, ont démontré l'expression du NGF et de ses deux récepteurs p75^{NTR} et TrkA dans les thymus de rats. Les études menées sur les modèles de souris invalidées pour les gènes des récepteurs p75^{NTR} et TrkA ont démontré l'implication de ces récepteurs dans le développement thymique [175]. Le BDNF et son récepteur TrkB sont également exprimés au sein de toutes les sous-populations de thymocytes, avec une expression plus importante chez les thymocytes les moins développés (cellules CD8- et CD4-), notamment avant la phase de double sélection lymphocytaire T. L'absence du récepteur TrkB dans les modèles TrkB-KO se traduit par une apoptose massive des thymocytes. L'axe BDNF/TrkB est ainsi impliqué dans la survie des lymphocytes T au cours de leurs maturations [176, 177].

Les érythroblastes, les progéniteurs éosinophiles et myélo-monocytaires expriment respectivement TrkA, TrkB et TrkC, ces cellules ne semblant pas exprimer p75^{NTR} [172].

Au niveau des progéniteurs de la lignée myéloïde, c'est l'axe NGF/TrkA qui joue un rôle dans la survie et la protection contre l'apoptose [178-180].

5. 2. Neurotrophines et lymphocytes B :

5. 2. a. NGF et Lymphocyte B :

- ***Expression du NGF et de ces récepteurs au niveau lymphocytaire B :***

Les lymphocytes B murins et humain normaux expriment à la membrane les récepteurs TrkA et p75^{NTR} et produisent du NGF biologiquement actif, dont la sécrétion autocrine est augmentée après activation mitogénique [181]. Cette dernière, de même que le stress, augmente l'expression membranaire de TrkA et de p75^{NTR}, l'internalisation de ces 2 récepteurs étant induite par des concentrations croissantes de leurs ligands [182].

- ***Modulation de la production d'immunoglobulines par le NGF :***

L'inactivation du gène de TrkA induit des anomalies fonctionnelles des lymphocytes B murins, ces souris présentant une hypergammaglobulinémie polyclonale, avec des concentrations sériques d'IgM et d'IgG2b élevées [183]. Ces résultats venaient conforter ceux obtenus *in vitro* par les équipes de Brodie et de Kimata et collaborateurs, sur l'effet modulateur du NGF au niveau de la production des immunoglobulines par les cellules lymphocytaires B [184-187] : le NGF est ainsi capable d'induire, après stimulation mitogénique et/ou en condition de co-culture lymphocytaire T, la production d'IgG, notamment d'IgG4, par les lymphocytes murins et humains, indépendamment de la voie du CD40/CD40L [188, 189]. En revanche, le NGF ne participe pas à la commutation isotypique [188, 189].

- ***Production autocrine et activation B***

Le NGF autocrine est produit par les lymphocytes B humains normaux. Il joue le rôle d'un facteur de survie, notamment dans les cellules B activées, les lymphocytes B mémoires ; il permet la régulation du facteur Bcl-2 (*B-Cell Lymphoma-2*) et la libération du cytochrome C [181, 190, 191]. Le traitement de lymphocytes B en culture par du NGF induit une protection contre l'apoptose et une augmentation de la prolifération notamment par l'activation de MAP-Kinases (*MAPK : Mitogen-*

Activated Protein Kinase). Cet effet pro-prolifératif est dose-dépendant et peut être synergique de l'action des cytokines IL-4 et IL-2, le NGF semblant exercer la même fonction que ces 2 cytokines au niveau des lymphocytes B matures [181, 192-194]. Par ailleurs, l'expression membranaire de TrkA est augmentée, *in vitro*, au niveau de lymphocytes B humains stimulés par différents mitogènes ainsi que par l'exposition à de l'IL-2, qui induit leur prolifération de façon dose-dépendante [192, 195].

La production et la sécrétion du NGF augmentent au cours de l'activation des lymphocytes B, particulièrement après stimulation par le LPS, le CD40 ou l'IL-4, cette production étant supprimée après adjonction d'un inhibiteur du facteur de transcription NF-KB [196]. L'activation de NF-KB est elle-même induite par le NGF ; il semble ainsi exister un lien entre contexte cytokinique et production lymphocytaire B de NGF, renforçant l'hypothèse d'un rôle de cette neurotrophine dans l'évolutivité de maladies auto-immunes [196]. Ces données *in vitro* sont corroborées par la constatation de concentrations sanguines élevées de NGF au cours des MAI, notamment du cours du Lupus Erythémateux systémique (LES), connectivite au cours de laquelle on observe également une augmentation de la production lymphocytaire B de NGF [196-197]. Ces données suggèrent une dérégulation des voies de sécrétion endogènes des neurotrophines lymphocytaires au cours de cette pathologie auto-immune [197].

- **NGF et modulation de la réponse immune :**

Le NGF régule également de façon positive la synthèse du CGRP (*Calcitonin Gene-Related Peptide*), et ce majoritairement au niveau des cellules B activées [198]. Le CGRP est un neuropeptide capable d'induire une inhibition de l'inflammation, en agissant sur la production d'IL-2 par les lymphocytes T, leurs proliférations mais aussi sur la présentation antigénique par les macrophages. Le NGF peut de ce fait avoir des effets anti-inflammatoires par son action sur les lymphocytes B [198]. Sa fixation à TrkA peut également moduler le cytosquelette des cellules lymphocytaires B, en agissant sur le remodelage des microfilaments F-actine [199].

- **NGF et résistance à l'apoptose dans les cellules B tumorales :**

Le stress cellulaire provoqué par une privation sérique induit une augmentation de la production du NGF par les lignées cellulaires B humaines issues de lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL : *Diffuse Large B Cell Lymphomas*) [200]. Dans ce modèle *in vitro*, la résistance à la mort cellulaire induite par le rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20 utilisé en immunothérapie) est diminuée par l'activation de voies de survie *via* une production autocrine du NGF, notamment par l'activation de l'axe NGF/TrkA. La sensibilité des cellules au traitement par le rituximab peut ainsi être corrélée aux taux d'expression de NGF et de TrkA dans le DLBCL [200].

5. 2. b. BDNF et Lymphocyte B :

- ***Expression du BDNF et de ces récepteurs au niveau lymphocytaire B***

Les lymphocytes B humains normaux produisent également du BDNF et expriment TrkB et p75^{NTR}, l'expression membranaire de ces 2 récepteurs étant induite par le stress cellulaire dans différentes lignées B quels que soient leurs stades de maturation [11]. En culture, cette production est augmentée lors de l'activation du lymphocyte B par du LPS (*Lipopolysaccharide*) ou de la PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) [201], mais n'est pas affectée *in vitro* par l'exposition à différentes cytokines, telles que l'IL-6 et le TNF- α [3, 201, 202]. Cependant, les transcrits du BDNF ne sont pas détectés dans les lymphocytes B circulants non stimulés [203].

Tout comme le NGF, le BDNF est synthétisé de façon plus importante par les lymphocytes B de patients atteints de LES en comparaison aux lymphocytes B de donneurs sains [197]. Les concentrations sériques de BDNF sont également plus élevées chez les patients atteints de LES mais aussi chez les patients atteints de syndrome de Gougerot-Sjögren comparés à celles des donneurs sains, ce qui suggère l'importance du BDNF dans le dysfonctionnement des lymphocytes B au cours de ces pathologies auto-immunes [197, 204].

La production lymphocytaire B de BDNF semble également contribuer à la réparation tissulaire au cours des myosites, une hyperproduction de BDNF ayant été décrite au niveau des cellules B infiltrant le muscle inflammatoire, notamment au niveau des foyers de régénération musculaire [205].

- ***Production autocrine et activation B :***

Tout comme les cytokines Th2 (IL4, IL13), le BDNF induit une augmentation de la production des IgE, et réprime parallèlement la production des cytokines Th1 (INF- α et IL12). Cette augmentation des IgE est par ailleurs diminuée par ces mêmes cytokines Th1, notamment chez les lymphocytes B des patients allergiques. Le BDNF peut donc influencer la polarisation lymphocytaire Th1/Th2, agissant de ce fait sur la production d'immunoglobulines [206-209].

- ***BDNF, résistance à l'apoptose et prolifération des cellules B tumorales :***

- *BDNF et lymphome B :*

Tout comme le NGF, le BDNF peut également diminuer l'apoptose induite par un stress sérique dans les lignées B [210]. Il a été démontré au sein de notre équipe que la sécrétion du BDNF endogène constitue un facteur de survie autocrine en réponse à un stress apoptotique induit par une privation sérique ou par l'activation de la voie Fas. L'activation du récepteur TrkB par le BDNF induit l'activation des signaux de survie, contrebalançant l'effet pro-apoptotique apporté par la liaison du pro-BDNF à l'hétérodimère p75^{NTR}/sortiline. Parallèlement à la sécrétion endogène de BDNF, l'expression membranaire de TrkB est augmentée au cours de stress cellulaire [11]. L'inhibition de la production autocrine de BDNF par shRNA (*short hairpin RNA*) induit le blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1 de 2 lignées de lymphome de Burkitt, Raji et Ramos [211]. La suppression de la production de BDNF induit une diminution de l'expression de Bcl-2 et une activation des caspases 3 et 9 avec clivage de la PARP (poly ADP-ribose polymerase). L'arrêt de la production autocrine du BDNF par ces cellules augmente également leur sensibilité au 5-Fluoro-uracile (5-FU) [211].

- *BDNF et myélome multiple :*

L'implication de l'axe BDNF/TrkB dans l'agressivité tumorale est également mise en exergue au cours du myélome. Ainsi dans des lignées plasmocytaires, l'effet anti-apoptotique de l'axe BDNF/TrkB, en réponse à des thérapeutiques humaines pro-apoptotiques, la dexaméthasone ou le bortezomib (un inhibiteur du protéasome) est dépendant de l'activation des voies des MAPK et de la PI3K (Phosphatidylinositol-3 Kinase) [212]. Le traitement des cellules myélomateuses avec du BDNF induit

également leur prolifération ainsi que leur migration. De plus, le traitement par le BDNF induit une augmentation de la néo-angiogenèse dans la moelle osseuse, associée à une augmentation du facteur pro-angiogénique VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), favorisant la tumorigénicité [213-216].

Les lignées myélomateuses produisent du BDNF mais aussi du pro-BDNF biologiquement actif. Ces cellules expriment des métalloprotéases de la famille des MMPs (*Matrix Metalloproteinases*), notamment la MMP-9, qui peut cliver le pro-BDNF en BDNF mature actif [217].

Le BDNF favorise également la résorption osseuse, en participant à l'activation des ostéoclastes, par une voie TrkB dépendante, *via* une modulation de la balance RANKL/ OPG [217, 218]. La résorption et l'invasion osseuse par les cellules tumorales sont limitées par le blocage de TrkB (shRNA) dans un modèle murin exprimant le clone myélomateux humain RPMI8226 [218].

- BDNF et leucémies aigues :

Les travaux de Li et son groupe ont démontré que l'activation de l'axe BDNF/TrkB joue un rôle important dans la leucémogénèse. En effet, chez les lignées murines leucémiques, le BDNF exogène protège contre l'apoptose induite par radiothérapie [219].

5. 2. c. NT-3 et Lymphocyte B :

Très peu de travaux ont rapporté l'expression de la neurotrophine-3 (NT-3) dans les lymphocytes B. Les travaux conduits par l'équipe de Brodie portant sur la régulation de l'expression des neurotrophines dans les lymphocytes murins, ont montré que la stimulation mitogénique par du LPS induisait une augmentation de l'expression de la NT-3 [202]. Les transcrits de la NT-3 sont détectés dans les lymphocytes B, mais pas son récepteur de haute affinité TrkC [209]. Il a été démontré *in vitro* que la NT-3, tout comme le NGF, favorisait la survie des cellules plasmocytaires isolées à partir de poumons de souris. Elle agit en augmentant l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 et en activant les voies de survie dépendantes de l'activation des facteurs de transcription NF-KB et XBP-1 (*X-Box Binding Protein-1*). Cette étude suggère que le NGF et la NT-3 participent, par la

survie des cellules plasmocytaires locales, au maintien de la production élevée des immunoglobulines, notamment des IgE, au niveau des voies pulmonaires dans des modèles allergiques [220].

Chez l'Homme, au cours du LES, outre les concentrations sériques élevées des neurotrophines BDNF et NGF, il a été rapporté que les concentrations sériques de NT-3 étaient plus élevées dans les formes les plus sévères et évolutives de cette pathologie auto-immune [197].

5. 3. Neurotrophines et lymphocyte T:

5. 3. a. Le NGF et lymphocyte T :

Les lymphocytes T (LT) expriment, comme les lymphocytes B, le NGF ainsi que son récepteur TrkA. *In vitro*, l'activation des lymphocytes T par des mitogènes ou par du LPS, induit une augmentation de leurs expressions [202, 221-223], notamment chez les LT polarisés Th2 [221, 223]. En parallèle, l'addition du NGF à des cultures de cellules lymphocytaires après activation, induit une augmentation de l'expression du récepteur à IL-2 (CD25) [193]. De plus, les travaux de la même équipe ont démontré que l'addition du NGF (10 ng/ml) en culture augmentait la production d'IL-2 par des cellules mononuclées activées par la concanavaline A (Con A). Cette production d'IL-2 est corrélée à l'augmentation de la prolifération cellulaire induite par l'addition de NGF aux cultures [224]. La production de NGF et l'expression de ces récepteurs à haute et faible affinités semblent dépendre de l'activation lymphocytaire T, plus particulièrement de la polarisation lymphocytaire T CD4 (Th1/Th2/Treg/Th17) que le NGF est capable de moduler [222].

En effet, les travaux réalisés avec des modèles de souris asthmatiques (sensibilisées par de l'ovalbumine) ont mis en évidence un profil Th2/Th17 prédominant associé à une augmentation des cytokines sériques IL-4, TNF- α et IL-17, concomitants des manifestations respiratoires. La neutralisation du NGF par des anticorps bloquants induisait une diminution de l'inflammation respiratoire *via* la régulation de la production cytokinique, marquée par une diminution de l'IL-4, du TNF- α et de l'IL17. Sa neutralisation induit parallèlement une augmentation de l'IL-10, de l'IFN- γ et du TGF- β associée à un profil Th1/Treg prédominant. La neutralisation du NGF par les anticorps bloquants induisait une expansion des lymphocytes

Th1/Treg améliorant le bronchospasme [225-228]. Le déséquilibre inflammatoire observé dans cette pathologie est donc induit par une polarisation lymphocytaire T avec un profil Th2/Th17 dépendant du NGF [225-228]. (**Figure 12**).

Le NGF est également détecté dans les surnageants des lignées T qui expriment les récepteurs TrkA et p75^{NTR} [229].

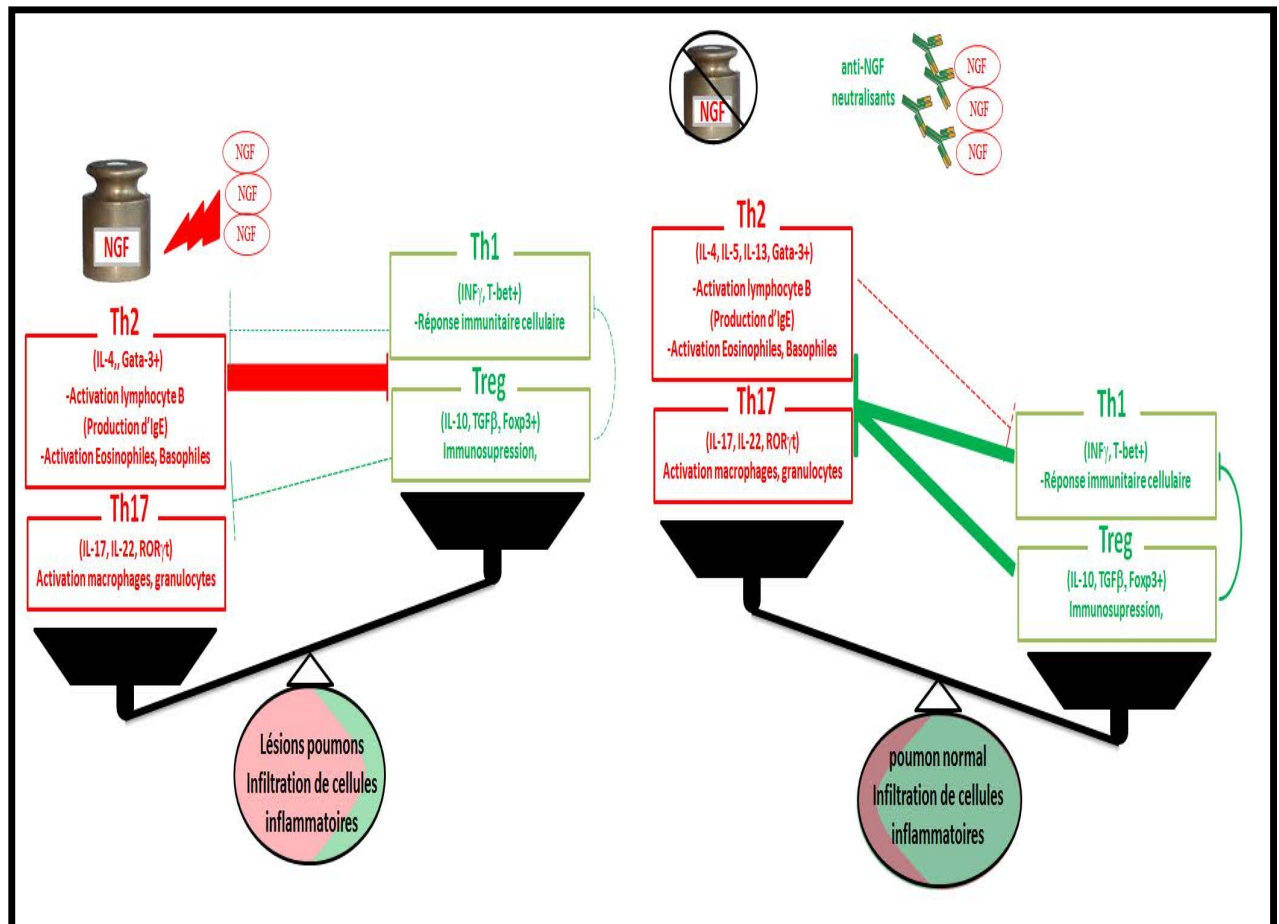


Figure 12 : Illustration schématique de l'implication du NGF dans la mise en place des profils d'activation lymphocytaires dans les manifestations allergiques inflammatoires (*d'après Shi. Inflamm. Res. 2012*) [228]). La sécrétion du NGF induit une polarisation lymphocytaire Th2/Th17, avec une sécrétion augmentée de cytokines IL-4, TNF-α et IL-17, concomitante des manifestations respiratoires (en rouge) ; la neutralisation du NGF contrebalance le profil d'activation T, en faveur d'un profil Th1/Treg avec une augmentation des cytokines INF-γ IL-10 et TGF-β inhibant l'induction du bronchospasme et de l'inflammation bronchique (en vert).

5. 3. b. BDNF et lymphocyte T :

Les lymphocytes T sont également capables de produire du BDNF [3, 230]. Cette production, présente notamment dans les lymphocytes T circulants, est

augmentée chez les patients atteints de sclérose en plaque (SEP) ayant des lymphocytes T auto-réactifs [230, 231]. Les analyses *in vitro* ont montré que la production du BDNF par les lignées lymphocytaires T était augmentée après stimulation par la phytohématagglutinine (PHA) ou par les anti-CD3, mais aussi par l'activation de la voie CD40L [3, 229, 230]. Ceci suggère que la production du BDNF par les cellules lymphocytaires T est soumise à une régulation. Toutefois, les études menées avec les souris inactivées pour le BDNF n'ont pas montré de dérégulation au niveau des différentes sous-populations lymphocytaires T présentes ou de leurs fonctionnalités [232]. Alors que la production lymphocytaire T de BDNF est augmentée après axotomie, celle-ci n'est pas responsable des phénomènes de neuro-réparation induits par ces cellules T ; en effet, les souris KO dont la production lymphocytaire T de BDNF présente une neuro-réparation identique aux souris contrôles [233, 234] [235].

L'inhibition ou la surexpression du récepteur TrkB induit une perturbation de la maturation des thymocytes. L'activation de TrkB par le BDNF induit une cascade de signalisation de survie, impliquant le facteur de transcription c-fos qui favorise la survie des thymocytes les plus immatures. De plus, le BDNF est également sécrété par les cellules du stroma thymique [176].

5. 3. c. NT-3 et lymphocyte T :

La neurotrophine-3 (NT-3) et son récepteur de haute affinité TrkC sont exprimés par les lymphocytes T, notamment après activation des cellules T par de la Con A, mais aussi par des anti-CD3 [202, 229, 236]. Cette expression est différente selon la polarisation des lymphocytes T. En effet, Sekimoto et ses collaborateurs ont montré que la NT-3 est bien produite par les lymphocytes T CD4⁺ polarisées Th2, mais pas par les Th1 ni les LT naïfs. Leurs travaux ont démontré que le traitement par de la NT-3 de cellules T activées par l'anti-CD3 induisait une augmentation de la production de l'IL-4 (cytokine Th2), mais n'affecte pas la production de l'INF- γ (cytokine Th1). Parallèlement, l'expression de son récepteur TrkC est augmentée par un profil Th2 et inhibée par un profil Th1 [236].

Des études ont montré l'importance du système immunitaire et particulièrement les lymphocytes T CD4⁺ activés dans la plasticité axonale induite par la neurotrophine-3 lors de lésions de la moelle épinière [237]. A l'inverse de ce

que qui a été démontré pour le BDNF, la réparation axonale dépend de la production de NT-3 et de l'existence d'une infiltration lymphocytaire locale, notamment liés à des lymphocytes Th2 [238].

5.4. Neurotrophines et les autres cellules du système immunitaire

5. 4. a. Neurotrophines et lymphocytes NK (Natural Killer) :

Bien que les cellules NK expriment à leurs surface les récepteurs aux neurotrophines TrkA, B et C [239, 240], les fonctions de ces derniers n'ont pas été approfondies dans ces cellules. L'une des rares publications dans ce domaine montre une augmentation de l'expression de TrkA par les cellules NK de souris traitées avec de IL-2. Néanmoins, l'ajout du NGF exogène n'induit pas de modification d'expression ni de survie de ces cellules [241]. Le récepteur p75^{NTR} associé à la sortiline, également exprimé dans ces cellules, peut induire la mort cellulaire par la liaison de pro-NGF [240].

L'infiltration lymphocytaire T et NK au niveau du système nerveux central est classiquement considérée comme une source d'aggravation de pathologies auto-immunes telles que la SEP. Les travaux de Hammarberg et ses collègues, dans les modèles d'EAE (*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*) ont montré dans que l'infiltration du système nerveux est due à des cellules T CD4⁺ et NK, exprimant le BDNF et la NT-3. Ces neurotrophines lymphocytaires pourraient de façon paradoxale limiter les lésions neuronales induites par les cytokines TNF- α et INF- γ [242].

5. 4. b. Neurotrophines et monocytes/macrophages :

Les cellules monocytaires sont capables de produire du BDNF, et cette production est augmentée par les cytokines IL-6 et TNF- α [243]. Les monocytes produisent également du NGF qui a la capacité de les protéger contre l'apoptose induite par les rayons Ultra-Violets ou par la gliotoxine, *via* l'augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 [244-245]. Par ailleurs, les macrophages expriment les neurotrophines NGF, BDNF, NT-3 et NT-4/5 [209, 246-248].

Le NGF et la NT-3 induisent une augmentation de l'expression de certaines chimiokines et de leurs récepteurs chez les macrophages comme le CXCL-12/CXCR-4 [249, 250]. La fonction des macrophages en tant que CPA (Cellules présentatrices d'Antigènes) professionnelles ne semble pas être modifiée par les neurotrophines [249, 250].

Dans le système nerveux central, les macrophages résidents, les cellules microgliales assurent, *via* la production de BDNF, le remodelage des synapses neuronales, une fonction majeure associée à l'apprentissage [251].

5. 4. c. Neurotrophines et mastocytes :

Les cellules mastocytaires sont également productrices de neurotrophines [252-255]. La liaison du NGF à TrkA peut induire l'activation, la prolifération, la différenciation et la dégranulation des mastocytes et donc la libération de l'histamine, jouant ainsi un rôle important dans la réaction allergique [256].

Les mastocytes synthétisent le NGF, le stockent et le secrètent dans le milieu extracellulaire, notamment dans la circulation sanguine. L'intensité de la réponse allergique est par ailleurs corrélée à l'augmentation des concentrations sériques du NGF libéré par ces cellules mastocytaires [256-258].

L'infiltration des mastocytes dans les muqueuses bronchiques après exposition à un allergène est suivie d'une augmentation des concentrations du NGF dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire chez les patients asthmatiques. Ces mastocytes sur-expriment à leur membrane le récepteur TrkA [259]. De même, l'expression du TrkB au niveau des mastocytes est également augmentée lors d'exposition à des allergènes chez des patients ayant une rhinite allergique [260].

Ainsi, le NGF, *via* sa liaison à TrkA induit l'activation, la survie et la dégranulation de ces cellules conférant au NGF un rôle clé d'amplification de la réponse allergique, notamment asthmatique [168, 261-263].

5. 4. d. Neurotrophines et polynucléaires/neutrophiles :

- **5. 4. d. i. Les éosinophiles :**

Les neurotrophines sont produites par les éosinophiles, et l'expression du BDNF, du NGF et de la NT-3 sont plus importantes chez des patients allergiques et asthmatiques [264]. Raap et son équipe ont démontré que les taux de BDNF dans les sérums de patients atteints d'eczéma atopique étaient plus élevés que chez les donneurs contrôles. L'analyse des surnageants de culture de cellules éosinophiles de patients atopiques a montré qu'ils produisent plus de BDNF que chez les donneurs contrôles. En parallèle, l'expression membranaire des récepteurs TrkB et p75^{NTR} était également plus importante chez les patients [265]. Dans une autre étude, le même groupe a montré que les concentrations de BDNF et de NGF dans les sérums des patients étaient corrélées à la sévérité de la maladie [266]. Le BDNF est également capable de protéger ces éosinophiles de l'apoptose basale en culture [265].

Les mêmes auteurs ont mis en évidence une variation des niveaux d'expression des NT et de leurs récepteurs au niveau des éosinophiles circulants de sujets sains, ou atteints de rhinite allergique ou d'une dermatite atopique [267]. Ainsi, l'expression de TrkA, de TrkC et de p75^{NTR} est maximale au cours de la dermatite atopique au cours de laquelle l'apoptose des éosinophiles est inhibée par le NGF, le BDNF et la NT-3, ces deux dernières NT augmentant le chimiotactisme de ces cellules [267].

Les cellules épithéliales des voies respiratoires produisent également du BDNF et du NGF, et participent ainsi à la survie des éosinophiles tissulaires, notamment chez des patients atteints d'allergies des voies respiratoires, et donc contribuent à l'inflammation dans ces tissus [268].

• **5. 4. d. ii. Les basophiles:**

Les basophiles expriment les récepteurs au NGF qui induit un effet pro-prolifératif synergique du GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*) [269]. Le NGF permet également d'augmenter la production et la sécrétion des cytokines Th2, particulièrement l'IL-4 et IL-13 par les basophiles activés [270-272]. Il induit également l'expression membranaire des IgE et la libération des leukotriènes [270, 271, 273, 274].

II. La Neurotensine:

1. Généralités :

La neurotensine (NTS) a été isolée en 1973 dans l'hypothalamus de bovin par Carraway et Leeman, l'injection de ce peptide à des rats induisait une dilatation du duodénum et une hypotension, ces effets biologiques étant à l'origine de son appellation, Neurotensine [275]. Les mêmes auteurs ont ensuite purifié et séquencé la NTS à partir d'extraits hypothalamiques bovins [276]. Elle est composée de 13 acides aminés. Chez l'Homme, son gène est localisé sur le chromosome 12 (12q21) [277]. La NTS est apparentée à un autre neuropeptide découvert au niveau du système nerveux périphérique de porc, la Neuromédine N (NN) [278]. Ces deux peptides, NTS et NN sont synthétisés à partir d'un précurseur commun, la pro-neurotensine, dont d'ADNc a été cloné pour la première fois dans le cerveau humain en 1992 [279], après avoir été cloné préalablement dans le tube digestif du chien [280]. Les deux peptides sont codés par le même exon. Les comparaisons de séquences ont révélé que les précurseurs sont identiques dans le système nerveux et dans le tube digestif, prouvant que le peptide synthétisé est le même dans les deux tissus. Chez le rat, la séquence du précurseur de la NTS et la NN a également été déterminée, montrant une grande homologie entre les espèces, ce qui indique que le gène de la NTS est conservé au cours de l'évolution [281], et suggère une conservation de la structure mais aussi de la fonction des neuropeptides synthétisés à partir de ces précurseurs. La séquence hexapeptidique en C-terminale est d'une importance capitale dans la liaison de la NTS à ses récepteurs [282, 283].

La pro-neurotensine/neuromédine N est composée de la neuromédine N et de la neurotensine en C-terminal ainsi que d'un peptide-signal de 22 acides aminés en N-terminal qui permet la translocation des peptides au cours de leur maturation et sécrétion. Entre les séquences des futures NTS et NN s'insèrent des doublets d'acides aminés basiques Lysine-Arginine (KR). Des pro-hormones convertases spécifiques (PC1 et PC2) vont cliver le peptide au niveau de ces doublets basiques, qui sont par la suite éliminés par une carboxypeptidase E [284-286]. A la suite de ces maturations, les deux principaux peptides matures sont synthétisés :

- La neuromédine N (NN) constituée de 6 acides aminés (Leu-Ile-Glu-Phé-Asp-Ile), qui peut agir directement sur les cellules musculaires lisse du tractus digestif en induisant leurs la contraction [278, 287].
- La neurotensine (NTS) constituée de 13 acides aminés (Glu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu) pour une de masse moléculaire 1674 Da [276].

La maturation de la pro-neurotensine/neuromédine N, peut également générer un autre précurseur de 117 acides aminés, noté pro-NTS/NN 1-117. Ce peptide est produit notamment par les cellules du tractus digestif suite à la prise d'un repas. Détectée dans la circulation, elle aurait les mêmes fonctions que la NTS avec une structure plus stable [285]. La maturation de la pro-NTS/NN peut également être différente au niveau quantitatif selon les tissus. Au niveau du système nerveux central, les quantités de NTS et de NN sont équivalentes. Dans le tube digestif, une forme plus longue de la neuromédine N est produite et sécrétée, la « Big-NN » [288, 289], alors qu'on retrouve une forme de plus longue de neurotensine « Big-NTS » produite par la surrénale [290] (**Figure 13**).

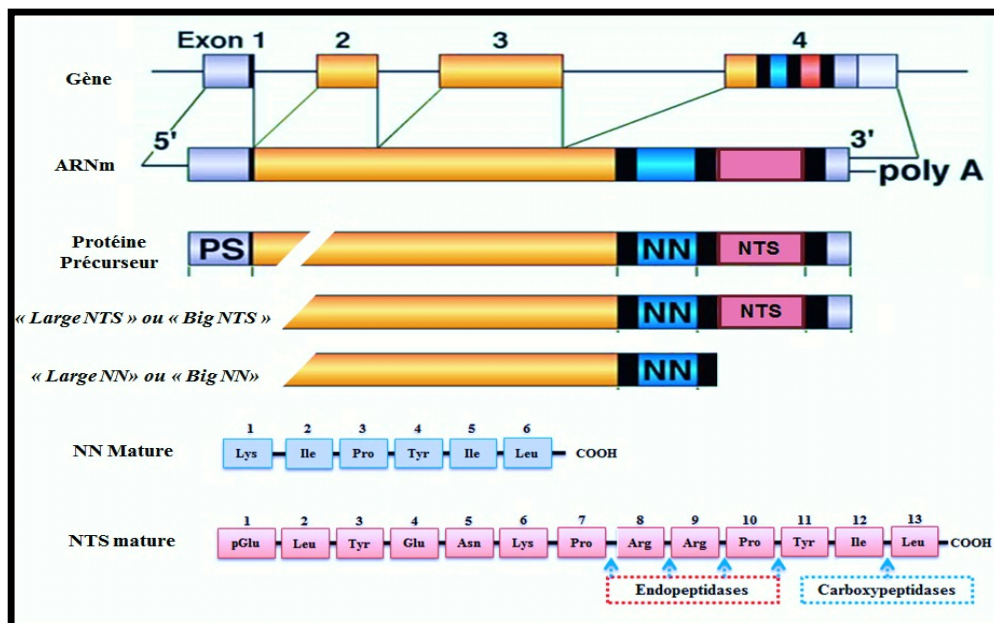


Figure 13 : Représentation schématique de la transcription du gène codant pour la protéine précurseur, la pro-Neurotensine/Neuromédine N (Pro-NTS/NN) et les étapes de sa maturation (*d'après Dobner et al. 1987 ; Kisklauskis et al. 1988 ; Carraway. et al. 1991 et Vincent et al. 1999 [280, 281, 291, 292]*).

Ce gène possède 4 exons, les séquences codantes pour la NTS et la NN matures sont localisées sur l'exon 4. La NTS est synthétisée en tant que protéine précurseur, la pro-Neurotensine/Neuromédine SAADA Sofiane| Biologie Santé/Immunologie-Oncologie| Université de Limoges | Année 2015

(pro-NTS/NN) NN). Ce précurseur est composé du côté N-terminal, d'un peptide signal (PS), de la Neuromédine N (NN) en bleu et de la Neurotensine (NTS) en rouge du côté C-terminal. Cette séquence est encadrée par trois doublets basiques (Lys-Arg), sites de clivage des pro-protéines convertases (PCs). Dans le cerveau, la pro-NTS/NN donne lieu à la NTS et à la NN. Dans l'intestin, il s'agit de la formation de NTS et d'un grand peptide (Large NN ou Big NN) contenant la séquence de la NN et une partie de la protéine précurseur en C-terminal. Dans les glandes surrénales, les principaux peptides produits sont la NTS, la *big-NN* et un grand peptide se terminant par la séquence de la NTS (*large NTS* ou *big NTS*).

La NTS mature est stockée dans des granules de sécrétion puis libérée sous l'impulsion du calcium intracellulaire. *In vivo*, la NTS est sécrétée dans la circulation sanguine lors de l'ingestion d'acides gras au cours d'un repas [293-297]. Chez le rat, la stimulation électrique du mésencéphale induit sa libération dans le cortex préfrontal [298]. Eriste et ses collaborateurs ont démontré que la neurotensine pouvait également avoir une isoforme biologiquement active, résultant d'une arginylation sur le résidu Glutamate (Glu) localisé en N-terminal. Cette modification post-traductionnelle génère un peptide ayant des propriétés de liaison aux récepteurs à la neurotensine (NTSRs), mais avec une affinité plus importante [299].

2. Neurotensine et système nerveux central :

La NTS est considérée comme un neurotransmetteur de localisation neuronale où elle se concentre dans les granules de sécrétion, dans les terminaisons nerveuses et/ou dans le corps cellulaire du neurone [300-304]. Chez l'Homme, les localisations de la NTS dans le système nerveux central sont proches de celles observées chez le rat, l'expression de la NTS étant cependant associée à sa fonction dans les différentes régions du système nerveux [300, 302, 305-308]. Ainsi, la NTS est principalement concentrée au niveau de la région dans laquelle elle a été identifiée, l'hypothalamus [275, 309]. Au niveau de l'hypophyse, elle module les pics de sécrétion de l'hormone LHRH (*Luteinizing Hormone Releasing Hormone*). Par ailleurs la NTS n'a pas ou très peu d'effet sur la production de l'hormone FSH (*Follicle-Stimulating Hormone*) [310, 311].

Au cours de la période embryonnaire, la NTS apparaît très tôt au cours du développement du système nerveux. Chez le rat, elle est détectée dès le 16^{ème} jour

de gestation, initialement dans le bulbe olfactif primitif et dans la zone de la future amygdale, ainsi que dans d'autres zones du cerveau antérieur et du diencephale, suggérant un rôle important de ce peptide dans la mise en place du système nerveux central [312-314].

Ainsi, la NTS apparaît dès les premières étapes du développement du système nerveux dans certaines zones (bulbes olfactifs, noyaux de l'amygdale, strie terminale, subiculum, cortex cingulaire, cortex entorhinal, noyau du tractus solitaire, striatum), puis son expression diminue rapidement au cours de la progression de l'ontogenèse [283, 308, 312-314]. A l'inverse, dans d'autres régions (cortex piriforme, noyaux ventriculaires de l'hypothalamus, noyau supra-chiasmatique et noyau du nerf trijumeau), l'expression de la NTS augmente progressivement au cours du développement, et se stabilise lorsque l'individu atteint son âge adulte [283, 308, 312, 313]. La NTS est particulièrement retrouvée dans l'hypothalamus, dans les aires de contrôles de la douleur où elle module la réponse nociceptive, agissant comme un analgésique ; elle intervient également dans le contrôle de la thermorégulation [315-323].

L'axe neurotensinergique régule également la neurotransmission ; en effet la NTS est co-localisée dans les vésicules de sécrétion de neurotransmetteurs comme la dopamine, montrant l'interaction de ces deux voies [324]. La NTS interagit également avec la voie cholinergique, en augmentant la sécrétion de l'acétylcholine chez le rat [325-329]. Elle interagit aussi avec les voies sérotoninergique [329-331], GABAergique [332, 333] et glutamatergique [334-336].

L'interaction de la NTS et sa capacité de modulation des différentes voies des neurotransmetteurs les plus actifs dans les réponses neuronales lui confèrent de façon indirecte des rôles dans la physiopathologie de désordres neuronaux et psychiatriques. Elle est notamment impliquée dans des pathologies neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson et de Huntington, mais également dans la schizophrénie [337, 338]. L'ensemble des actions de la NTS dans le système nerveux central en physiologie et en pathologie est confirmée par le modèle de souris inactivées pour ce neuropeptide [339].

Au niveau de la moelle épinière, la NTS est également détectée, avec des densités importantes dans les zones de la substance gélatineuse de Rolando [301, 308, 340].

3. Neurotensine dans le tube digestif :

La NTS présente hors système nerveux central est principalement localisée au niveau du tractus gastro-intestinal (œsophage, estomac et intestin grêle). Sa fonction dans ces tissus est neuroendocrinienne. Elle est impliquée dans le développement du tractus intestinal. Son expression augmente progressivement jusqu'à l'âge adulte. Cette augmentation peut être transitoirement accrue, notamment lors de la transition de l'alimentation exclusivement lactée à un régime plus diversifié [309, 341-347].

Chez l'homme, la NTS est en grande majorité synthétisée par les cellules endocrines iléo-jéjunales, dans les cellules gastriques et les cellules musculaires lisses de l'intestin [309, 348-350]. Outre une action dans la motricité et la croissance des cellules intestinales, elle module la composition des sécrétions pancréatiques et gastriques dans le but de faciliter la digestion des aliments, particulièrement des lipides [351-355].

La NTS est soumise à une désactivation protéolytique importante. Tout comme les autres neurotransmetteurs, elle est dégradée très rapidement par des endopeptidases et des carboxypeptidases, notamment dans le système nerveux central [356, 357].

Tableau 1 : Illustration du niveau d'expression de la neurotensine dans les différents tissus périphériques (non neuronaux) (*D'après Zsürger et al. Brain Res. 1992 [289, 358-360]*).

Tissus	Niveau d'expression	Références
Estomac	++	[289]
Duodénum	++	
Jéjunum	++++	
Iléon	++++	
Caecum	++	
Colon	+/-	[289, 360]
Foie	Non détectée	[289]
Pancréas	+	
Rein	+	
Poumon	Non détectée	
Coeur	+	
Médulo-Surrénale	++	[359]

4. Les récepteurs à la neurotensine :

Les premières études menées sur les récepteurs de la NTS suggèrent l'existence de deux sites différents de liaisons, notamment dans le système nerveux central des rongeurs [361, 362], mais aussi chez l'Homme [358, 363]. Ces deux sites de liaison se distinguent par leurs différences d'affinité à la NTS, avec une haute affinité pour le premier ($K_d=0.15 - 0.5$ nM) et une faible affinité pour le second ($K_d= 5 - 7$ nM) [364, 365]. Les récepteurs à la NTS sont actuellement identifiés et notés NTSRs (*Neurotensin Receptors*). Les deux premiers NTSR1 et NTSR2 sont des récepteurs couplés à des protéines-G (RCP-G), similaires aux autres récepteurs aux neuropeptides, avec 7 domaines transmembranaires [292, 366] (**Figure 14**). Le troisième récepteur NTSR3 est également appelé sortiline. C'est un récepteur de type-I qui est une protéine-récepteur de la famille à domaine Vps10 (Vacuolar protein sorting-10) [151, 367]. La sortiline fut est apparentée à une protéine de « sorting » initialement identifiée chez la levure [368]. Elle est principalement localisée en intracellulaire de par sa fonction primaire de transport et de sécrétion des protéines depuis le réticulum endoplasmique vers le milieu extracellulaire ou dans le réseau trans-golgien (*TGN : Trans-Golgi Network*) [369].

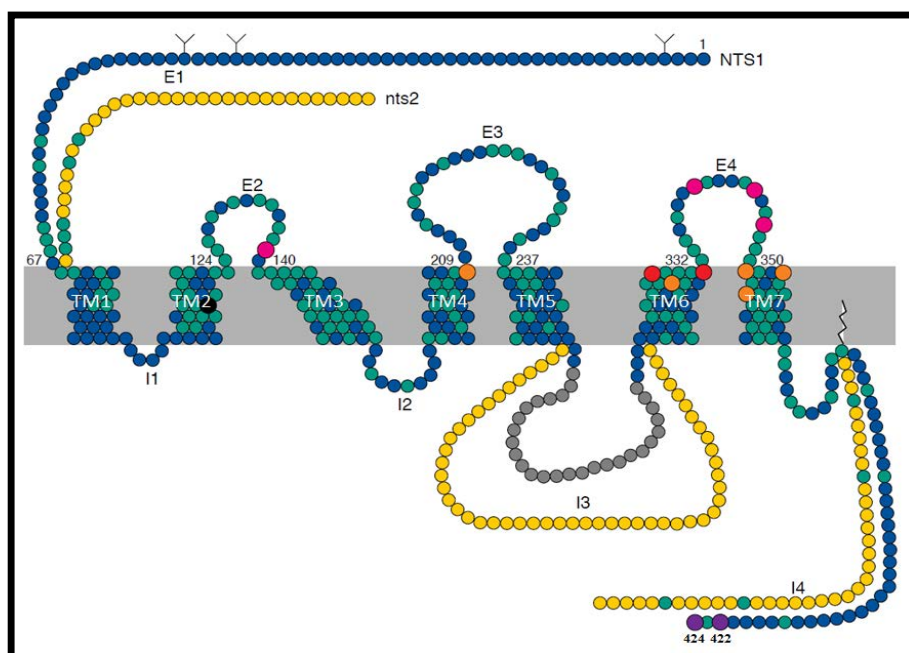


Figure 14 : Représentation schématique comparative des structures des récepteurs NTSR1 et NTSR2 chez le rat (*D'après Vincent. Trend Pharmacol Sciences.1999 [292]*).

Les 2 récepteurs comportent 7 domaines transmembranaires (TM 1 à 7). E1, E2, E3, E4 et I1, I2, I3, I4 désignant respectivement les boucles extracellulaires et intracellulaires. Les résidus spécifiques de NTSR1 sont en bleu et ceux de NTSR2 en jaune, et les acides aminés invariants entre les deux récepteurs en vert. Les sites spécifiques de liaison de la neurotensine (rose) ainsi que les sites spécifiques de liaison de l'inhibiteur pharmacologique de NTSR1 (SR48692) (orange) sont indiqués. Les sites de liaison communs à la neurotensine et au SR48692 sont marqués en rouge. Les résidus 422 et 424 (violet), sont indispensables à l'internalisation de NTSR1. La boucle I3 en gris, représente le site de liaison de la Phospholipase C. Plusieurs sites de glycosylation sont identifiés symbolisés (Y), notamment du côté extracellulaire.

4. 1. NTSR1:

4. 1. a. Structure :

Le gène de NTSR1 et son promoteur ont été initialement clonés chez le rat, grâce au criblage des banques de cDNA de cerveau [370, 371]. Chez l'Homme, NTSR1 a été cloné à partir d'une lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal, HT29 [372]. La protéine NTSR1 est un récepteur transmembranaire qui est composé de 424 acides aminés chez le rat et de 418 chez l'Homme. Il est composé de 4 boucles du coté extracellulaire (notées : E1, E2, E3 et E4) et de 4 boucles du coté intracellulaire (notées : I1, I2, I3 et I4). Il traverse la membrane plasmique par 7 domaines transmembranaires (**Figure 14**). Ce récepteur comporte 2 cystéines présentes dans les boucles extracellulaires E1 et E2, ainsi que 4 sites de glycosylation situés au niveau N-terminal et dans la boucle extracellulaire E2 [292]. L'analyse de la génétique de ce récepteur chez le rat, notamment des mutations centrées sur les résidus chargés ou hydrophobes et aromatiques, a fourni des données intéressantes concernant les résidus spécifiques impliqués dans la liaison à la fois de la NTS mais aussi de son antagoniste, le SR 48692 (Meclinertant ®) (**Figure 15 - b**) [373-377].

Ainsi, par mutagenèse dirigée, les principaux sites de liaison de la NTS et de l'antagoniste SR48692 au récepteur NTSR1 ont été confirmés. La NTS peut se fixer *via* 3 acides aminés au niveau de la boucle E4 (Trp339, Phe341 et la Tyr349) [374, 375, 378].

La séquence d'acides aminés du récepteur NTSR1 chez l'Homme est homologue à environ 84% de celle identifiée chez le rat par l'équipe de Nakanishi [370, 372]. Son gène est localisé sur le chromosome 20q13. Quatre exons codent pour deux transcrits. Le premier (NM_002531), constitué de 4132pb, code pour une protéine de 418 acides aminés, pour une taille d'environ 55 kDa. Le second, non codant, est constitué de 2950pb. Plusieurs études ont montré que le récepteur NTSR1 peut être glycosylé. Sa glycosylation est associée à sa relocalisation membranaire et à l'activation de ce récepteur [379-381].

4. 1. b. Localisation tissulaire, signalisation et régulation :

- **Localisation tissulaire :**

Le récepteur NTSR1 apparaît tôt au cours du développement embryonnaire. Les expériences d'hybridations *in situ* et d'autoradiographies chez le rat ont montré que les transcrits de NTSR1 sont détectés à partir du 16^{ième} et 18^{ième} jour du développement embryonnaire au niveau du cerveau, particulièrement au niveau de la région du cortex, puis ce pic d'expression décroît au cours de la première semaine à 10 jours suivant la naissance [382-384]. Chez l'Homme, grâce aux techniques de radio-marquage et d'autoradiographie de la NTS, la localisation du récepteur NTSR1 dans le cerveau a été mise en évidence, particulièrement dans le *locus niger*, dans les noyaux de l'amygdale, l'aire tégumentaire ventrale, dans le cortex cingulaire, enthorinal et olfactif [385-388].

En dehors du système nerveux central, la localisation du récepteur NTSR1 suit la même distribution que l'expression de la NTS, principalement dans le tube digestif et l'estomac [389-391]. NTSR1 est également exprimé dans le foie, le pancréas et dans l'utérus [392-396], mais aussi au niveau du ganglion parasympathique [397]. Au niveau de la moelle épinière, NTSR1 est détecté exclusivement dans la substance gélatineuse de la corne dorsale, ce qui renforce le rôle potentiel de la NTS et de ce récepteur dans l'action anti-nociceptive [398]. Les souris KO NTSR1 présentent des anomalies de la thermorégulation, un syndrome extra-pyramidal et des troubles de la motilité. L'interaction de la NTS avec le système dopaminergique est également perturbée par la perte d'expression de ce récepteur, avec des perturbations du système dopaminergique méso-limbique, contrôlant la production de l'hormone de satiété, la leptine [399].

- ***Inactivation de NTSR1 et réponse à la neurotensine :***

Le modèle murin inactivé pour NTSR-1 génère des souris viables et de comportement normal, avec une fixation de la NTS sur NTSR2 au niveau cérébral comparable à ce qui est observé chez les souris sauvages ; en revanche, ces souris NTSR1^{-/-} présentent une absence de réponse hypothermique après injection de NTS [400]. Ces souris NTSR1^{-/-} se caractérisent également par un comportement alimentaire d'hyperphagie ; la nociception est en revanche inchangée [21, 400].

- ***Régulation de l'expression membranaire du récepteur NTSR1 :***

Les travaux de Scarceriaux et son équipe ont montré que l'expression du récepteur NTSR1 peut être soumise à une régulation négative par la NTS. Dans le système nerveux central, la stimulation de l'hypothalamus par de la forskoline ou de la dexaméthasone induit une production de NTS qui régule négativement la production de NTSR1. De plus, le traitement de l'hypothalamus par de la NTS exogène induit les mêmes effets de diminution de l'expression du récepteur NTSR1.

Le traitement prolongé de culture primaires de neurones fœtaux par un analogue de la neurotensine, le JMV-449 ([Lys⁸-(CH₂NH)-Lys⁹]-Pro-Tyr-Ile-Leu), induit une dégradation des transcrits de NTSR1 [401, 402]. Inversement, le traitement de certaines aires du système nerveux central, notamment l'hypothalamus du rat, par l'antagoniste de NTSR1, le SR48692, induit une augmentation de l'expression transcriptionnelle de ce récepteur [403, 404]. Les mêmes résultats de modulation transcriptionnelle de NTSR1 sont obtenus *in vitro* avec l'agoniste de NTSR1, le JMV449 au niveau de cellules malignes issues de neuroblastome humain ou murins (lignées CHP212 et N1E-115), d'adénocarcinome colique (HT29). De façon intéressante, le traitement par l'agoniste de la NTS JMV 439 diminue l'expression de NTSR1 au niveau de culture primaire de neurones embryonnaires de rat, cet effet étant aboli par le traitement préalable de ces cellules par l'antagoniste de NTSR1 le SR48692, suggérant une régulation négative dépendant de la liaison

NTS - NTSR1 [402, 405, 406]. Par ailleurs, une diminution du nombre de sites potentiels de liaison sur le récepteur NTSR1 exprimés est observée chez certaines lignées cellulaires de neuroblastome. Cette diminution serait due à une rétention du récepteur dans des vésicules de stockage intracellulaire [407-409].

Les études dose-réponse à l'inhibiteur SR48692 ont montré une plus grande affinité pour NTSR1 (avec un K_d de l'ordre de 100 à 300 pM) [410]. Cet inhibiteur non peptidique (**Figure 15- b**), bloque les effets de la NTS et la transduction du signal, tels que la production de l'inositol phosphate et le signal calcique [411, 412]. Des mutations induites sur les boucles extracellulaires E3 et E4 du récepteur NTSR1 ont mis en évidence plusieurs sites impliqués dans la liaison de cet inhibiteur [374, 413, 414]. L'injection de cet antagoniste à des rats inhibe la locomotion induite par l'injection de la NTS dans le système nerveux central [415, 416]. Toutefois, chez les rongeurs, le SR48692 n'affecte pas l'effet hyperthermique ou analgésiant induit par la NTS. Ces données suggèrent que les effets primaires induits par la NTS ne passent pas systématiquement par le récepteur NTSR1 [417].

Cependant, le SR142948A, un autre antagoniste reconnaissant les deux récepteurs NTSR1 et NTSR2 (**Figure 15-c**) est capable d'inhiber certains effets induits par l'injection de la NTS dans le système nerveux central, tels que l'hyperthermie et l'analgésie [411, 418], suggérant que ces fonctions dépendent du récepteur NTSR2 lors de son activation par la NTS.

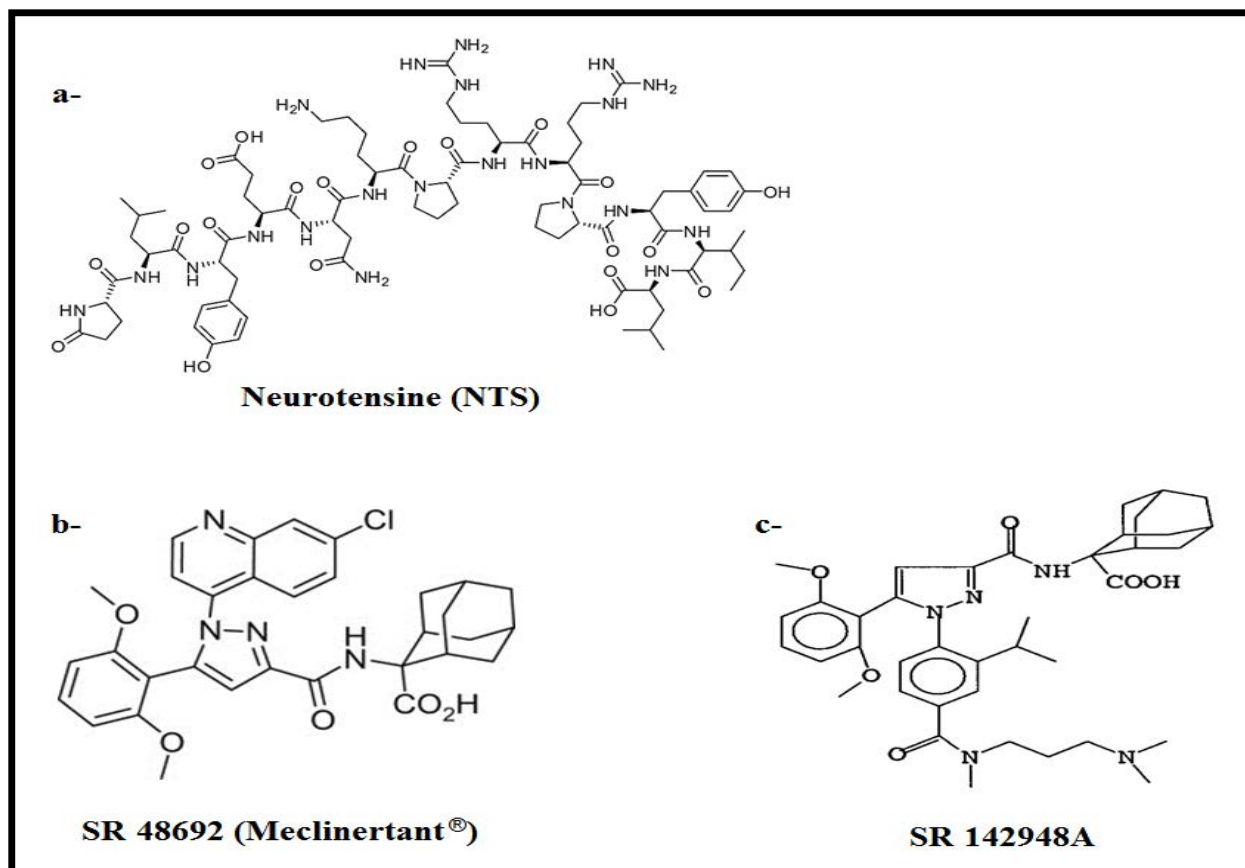


Figure 15 : Représentation schématique de la structure chimique linéaire de la NTS (a) et des antagonistes non peptidiques des récepteurs NTSRs (D'après Baxendale *Bioorg Med Chem* 2013 *et. Gully. J Pharmacol.Ther. Exp. Ther.* 1997 [411, 419]). L'antagoniste SR48692 ou Meclintertant® (b), agit spécifiquement sur le récepteur NTSR1, alors que l'antagoniste SR142948A (c) interagit avec les deux récepteurs à la neurotensine, NTSR1 et NTSR2.

- **Signalisation intracellulaire induite par la fixation de la NTS sur NTSR1:**

L'interaction de la NTS avec le récepteur NTSR1 membranaire induit la transduction d'un signal intracellulaire. Le récepteur NTSR1 fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines-G (RCPG), et donc capable d'activer les seconds messagers, dépendant notamment du recrutement et de l'activation de la phospholipase C (PLC γ la voie de la Phosphatidyl-Inositol-diphosphate (PIP2 : Phosphatidyl-Inositol-4,5-Diphosphate), qui génère de l'Inositol 3-Phosphate (IP3) et de la Di-Acyl Glycerol (DAG) [292, 420, 421]. Ces seconds messagers vont induire une augmentation du calcium intracellulaire, et l'activation de la kinase PKC (Protein Kinase C) et par conséquent l'activation des voies des MAPKs/Erk (*Mitogen*

Activating Protein Kinases/Extracellular Signal-regulated Kinase) [422-428] et de la NO-synthase [429, 430] (**Figure 16**).

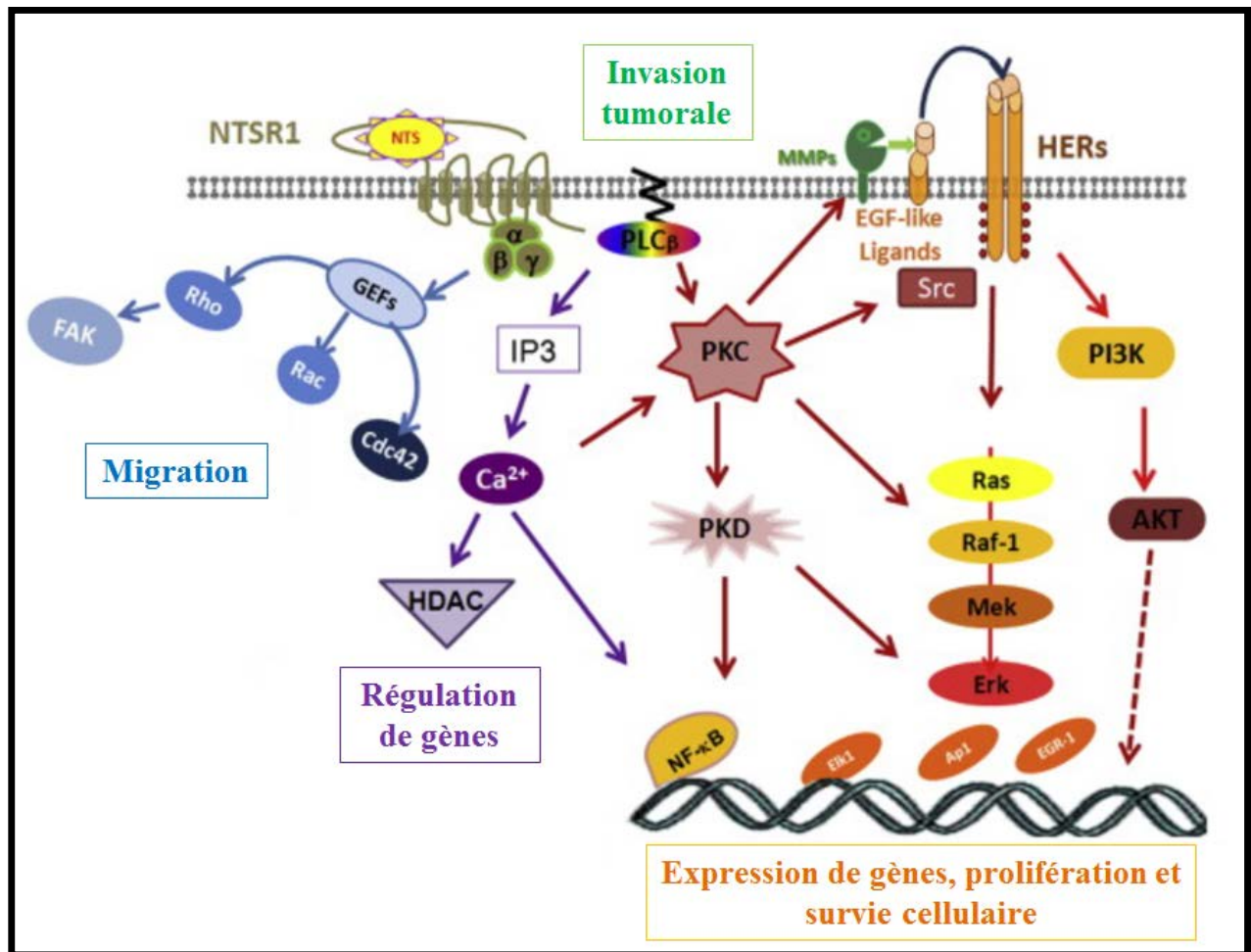


Figure 16 : Illustration schématique de la signalisation intracellulaire induite par la stimulation du récepteur NTSR1 par la NTS et associée à la cancérogenèse (d'après Dupouy 2011 [431]).

L'interaction de la NTS avec le récepteur NTSR1 conduit à la survie et à la prolifération cellulaire via l'activation de la Phospholipase C-γ (PLCγ), des stocks de calcium intracellulaires et de la PKC. La NTS peut également stimuler la transcription de son propre gène et de celui de l'EGF (Violet), conduisant ainsi à une transactivation des récepteurs EGFR pouvant conduire à une prolifération et une invasion tumorale (Vert), à la survie et la croissance cellulaire (Orange), à la mobilité et la migration cellulaire (Bleu) via l'activation de différentes voies intracellulaires.

- **Localisation cellulaire de NTSR1 et modulation de la signalisation :**

Les récepteurs couplés aux protéines-G (RCPG), récepteurs de surface cellulaire, sont généralement connus pour transduire un signal à des seconds

messagers tels que l'AMP cyclique (AMPC) exclusivement à partir de la membrane plasmique. Toutefois, les études les plus récentes indiquent que les RCPG peuvent continuer à induire leur signalisation après internalisation de leurs ligands/agonistes dans la cellule ainsi déclencher une nouvelle transduction du message, totalement différente de celle opérant à la membrane [432]. L'internalisation des récepteurs couplés aux protéines-G de la NTS a été mise en évidence dans plusieurs modèles d'études [433]. Chez le rat, la Thr422 et la Tyr424 localisées au niveau de l'extrémité cytoplasmique (Boucle I4), jouent un rôle crucial dans l'internalisation du récepteur NTSR1 [434].

L'endocytose de NTSR1 a lieu dans des vésicules endosomales. Celles-ci migrent à l'intérieur de la cellule, fusionnent avec une vésicule de lysosome qui en dégrade leurs contenus [407, 423, 435-439]. Le trafic intracellulaire de ces vésicules ainsi que la dégradation enzymatique par le lysosome de leur contenu sont cruciaux dans la régulation de l'expression et la signalisation du récepteur NTSR1 [440-442]. L'internalisation de NTSR1 est bloquée par le SR48692 [443]. Cette internalisation du récepteur NTSR1 est également observée, *in vitro*, au sein de la lignée de cancer colique HT29, en cas d'hétérodimérisation membranaire de ce récepteur à la sortiline [444]. En revanche, la réponse cellulaire à la NTS après internalisation de NTSR1 ou de l'hétérodimère NTSR1-sortiline diffère, notamment en ce qui concerne l'activation de Erk [443-445].

4. 2. NTSR2:

4. 2. a. Structure :

NTSR2 est le second des récepteurs à la NTS à avoir été cloné dans le cerveau de la souris par Mazella et son équipe en 1996 [446]. L'équipe de Chalon lors de leurs études des banques d'ADNc d'hypothalami de rats, a montré la présence d'un second récepteur avec une forte homologie (près de 64%) au récepteur NTSR1 précédemment décrit [447]. Puis, Vita dans les laboratoires de recherche de Sanofi, a cloné NTSR2 à partir du cortex humain [448]. NTSR2 est, comme NTSR1, un récepteur transmembranaire de la famille des RCPG avec 7 domaines transmembranaires (TM1 à TM7). Chez l'Homme, NTSR2 légèrement plus court que son homologue NTSR1, est constitué de 410 acides aminés et présente une extrémité N-terminale plus courte que celle de NTSR1, mais une troisième

boucle intra-cytoplasmique (I3) plus longue (une vingtaine d'acides aminés de plus) (**Figure 14**) [292]. Toutefois, à ce jour, aucune donnée ne démontre la glycosylation de NTSR2. Ce récepteur est également caractérisé par l'absence de résidu Asp¹¹³ (Aspartate) retrouvé au niveau du second domaine transmembranaire (TM2) de NTSR1, l'Asp¹¹³ étant remplacé par une Ala⁷⁹ (Alanine) sur la protéine NTSR2. Ce résidu conservé dans les seconds domaines transmembranaires (TM2) des RCPGs et qui leur confère leur sensibilité au sodium est absent et favorise l'interaction avec la protéine-G et augmente l'affinité du récepteur à son agoniste [421, 446, 447, 449]. NTSR2 est un récepteur de faible affinité pour la NTS ($K_d = 2\text{nM}$) [446].

Chez l'Homme, le gène NTSR2 est localisé sur le chromosome 2p25. Il code également pour quatre exons, pour un transcrit de 1569 pb (NM_012344). Chez la souris, les expériences de *Northern blot* menées sur des cerveaux ont montré qu'un second transcrit du gène *NTSR2* codait pour un second variant du récepteur, noté vNTSR2. Cette isoforme est le résultat d'une délétion suite à un épissage alternatif. Chez le rat, cette isoforme plus courte (environ 281 acides aminés contre 410 acides aminés pour la forme longue) est déletée de son cinquième domaine transmembranaire et des boucles I4 et E4. Les analyses de RT-PCR sur les cerveaux de rats ont confirmé l'expression du vNTSR2 dans le bulbe olfactif, le néocortex et dans l'hypothalamus [450-453]. Son expression est limitée au système nerveux. Toutefois, l'isoforme vNTSR2 n'est pas exprimée dans les cellules gliales [454].

4. 2. b. Localisation tissulaire et régulation:

NTSR2 est également appelé « *Levocabastin-sensitive Neurotensin Receptor* ». La Lévocabastine (**Figure 15-b**), est un antagoniste de récepteur H1 à l'histamine, qui agit également de manière compétitive avec la NTS au niveau des sites de liaison du récepteur NTSR2 [447]. La liaison de NTSR2 à la Lévocabastine est à haute affinité, à l'inverse de ce qui est observé avec le récepteur NTSR1 [447].

Le récepteur NTSR2 a également été décrit comme étant sensible à l'antagoniste de la neurotensine, le SR1492948A (**Figure 15-c**) et non sensible au SR48692 (Meclinetant ®) [411, 448]. Toutefois, des effets paradoxaux de cet

inhibiteur ont été décrits pour le récepteur humain dans des modèles de transfection [448, 455].

Les premières études de radio-marquage de la NTS après traitement à la Lévocabastine, ou par radio-marquage direct de la Lévocabastine, ainsi que les expériences de RT-PCR et d'hybridation *in situ* menées chez les rongeurs, ont démontré que le récepteur NTSR2 était principalement exprimé dans le cerveau, notamment dans les zones du cortex préfrontal, des régions hippocampiques, hypothalamiques et du cervelet [362, 412, 446-448, 456, 457]. La présence de NTSR2 dans les cellules neuronales a été confirmée par l'équipe de Sarret [458]. L'expression de NTSR2, également démontrée au niveau astrocytaire, peut être diminuée par la stimulation pro-inflammatoire induite par le LPS [459].

Chez l'Homme, le récepteur NTSR2 est également exprimé au niveau du tractus digestif, dans l'estomac et les intestins, et ce particulièrement au niveau des membranes plasmiques des cellules pariétales de la muqueuse gastrique [460]. Cette expression a été également démontrée dans le système digestif chez le rat [461], et chez le chien [462]. Le récepteur NTSR2 est également exprimé dans le pancréas endocrine où il joue un rôle anti-apoptotique sur les cellules β des îlots de Langerhans [460, 463, 464], dans l'utérus [465, 466] et dans le rein [448, 467].

La fonction du récepteur NTSR2 est principalement étudiée au niveau du système nerveux central, où il est impliqué dans la régulation de la nociception induite par la NTS. L'effet analgésique de la NTS est inhibé par l'utilisation d'oligonucléotides-interférents ciblant NTSR2 [411, 468-471]. De plus, l'inhibition de l'expression du récepteur NTSR1 par des oligonucléotides-interférents n'affecte pas l'effet analgésique de la NTS [472]. Les analyses des modèles murins de KO NTSR1 de l'équipe de Pettibone ont montré par le test de sensibilité sur plaque chauffante, que les souris homozygotes (NTSR1^{-/-}) étaient insensibles à l'effet analgésique induit par la NTS, contrairement aux souris hétérozygotes (NTSR1^{+/-}) et sauvages (NTSR1^{+/+}) [400]. Ces observations, complétées par l'étude menée par l'équipe de Maeno, comparant la nociception entre les deux modèles murins des KO NTSR1 et KO NTSR2, ont confirmé le rôle important joué par NTSR2 dans l'induction de l'analgésie par la NTS [473]. Les souris KO NTSR2 montrent également un déficit de la mémoire liée à un réflexe conditionné, sans qu'un déficit au niveau du système locomoteur ne soit recensé [474].

La signalisation induite par l'interaction NTS/NTSR2 n'est pas complètement élucidée. La surexpression de ce récepteur dans différents modèles cellulaires a permis de comprendre quelques mécanismes de la transduction du signal induite par l'activation de NTSR2. La transfection de cellules COS par le vecteur NTSR2 humain a montré que ce récepteur avait une activité constitutive, capable d'induire une augmentation de la production de l'Inositol Phosphate (IP) [475]. Une stimulation de NTSR2 par la neurotensine ou la Lévocabastine induit une augmentation du calcium intracellulaire ainsi qu'un recrutement de la voie Erk [476].

Les récepteurs NTSR1 et NTSR2 sont tous les deux internalisés après leurs interactions avec la neurotensine. Ainsi, la transfection de NTSR2 murin dans des modèles de lignées cellulaires humaines a montré que NTSR2 peut être recyclé à la membrane plasmique en faisant intervenir la protéine chaperonne NEEP-21 (*Neuronenriched endosomal protein de-21 kDa*) [477, 478]. De plus, la suppression de cette protéine par des ARNs interférents a montré une inhibition importante du recyclage de NTSR2 après son internalisation [477]. Par ailleurs, le recyclage du récepteur NTSR2 murin dépend la phosphorylation d'un seul résidu Tyrosine (Tyr237), localisé au niveau de la boucle intracellulaire (I3) [479]. Chez l'Homme, le résidu Tyrosine (Tyr237) est remplacé par une Cystéine, expliquant l'absence du recyclage de ce récepteur [479].

4. 3. NTSR3/Sortiline :

4. 3. a. Structure :

- **Structure de la sortiline et protéines apparentées :**

La sortiline a été isolée pour la première fois dans l'équipe de Mazella, comme le troisième récepteur à la neurotensine (NTSR3) dans le cerveau humain [480]. C'est une protéine de transport de 95 KDa qui appartient à la famille des protéines de transport à domaine Vps10 (*Vacuolar protein sorting-10 Domain*). Quatre autres membres de la famille des protéines à domaine Vps10 sont connus chez les mammifères : SORLA, SorCS1, SorCS2, et SorCS3 [481-483] (**Figure 17**).

La sortiline/NTSR-3 a été détectée par Northern et Western-blot dans le cerveau, la moelle épinière, les muscles squelettiques, le cœur, la thyroïde, le placenta et les testicules [151]. Par la suite, les analyses d'immuno-histochimie et

d'hybridation *in situ* menées sur les cerveaux de rats ont montré une large distribution dans les corps cellulaires neuronaux, les dendrites du bulbe olfactif, le cortex piriforme, la substance noire, le septum latéral et les noyaux thalamiques [484].

La sortiline est principalement localisée en intra-cellulaire au niveau des neurones et des oligodendrocytes (appareil de Golgi et les vésicules du réticulum endoplasmiques), un faible pourcentage de la protéine étant situé au niveau de la membrane plasmique [484].

La sortiline a été initialement décrite comme co-récepteur de la RAP (*Receptor-Associated Protein*) [151, 485, 486]. Contrairement aux deux premiers récepteurs à la neurotensine de type RCPG (NTSR1 et NTSR2), la sortiline possède une fonction de récepteur de type I [151, 367, 487]. Elle apparentée à une protéine de « *sorting* » identifiée chez la levure comme un récepteur de transport d'enzymes lysosomales du Golgi vers la vacuole [368]. Contrairement aux autres récepteurs à la neurotensine, la sortiline ne possède qu'un seul domaine transmembranaire, son domaine extracellulaire est large et possède une grande homologie avec la carboxypeptidase Y de la levure, notamment au niveau du domaine de Vps10p [151, 487-489] (**Figure 17**). Il comprend deux régions homologues avec un motif C-terminal à l'extrémité de chaque région contenant un domaine riche en cystéines (10 résidus de Cystéine ou motifs à 10CC) (**Figure 17**). La distance entre les résidus de Cystéine est conservée au cours de l'évolution. La sortiline/NTSR3 présente la même affinité à la NTS que celle du récepteur NTSR1 [480].

La sortiline est synthétisée sous forme de pro-sortiline. Durant sa maturation post-traductionnelle au niveau de l'appareil de Golgi un fragment d'environ 44 acides aminés du côté de l'extrémité N-terminal est clivé, donnant la sortiline mature [490]. Durant cette maturation, un petit peptide de 17 acides aminés est généré, appelé, la spadine Ce pro-peptide est capable de se lier au récepteur NTSR3 mature avec une haute affinité ($K_d=5$ nM). La spadine exerce un rôle d'antagoniste du canal potassique TREK-1 et peut également interagir avec le système sérotoninergique impliqué dans la dépression. Ce dérivé naturel de la sortiline pourrait constituer une nouvelle molécule à visée anti-dépressive [491-493].

- **Clivage des domaines extra- et intra-cellulaires de la sortiline :**

Comme les autres protéines à domaine Vps10, la sortiline possède une séquence consensus (RXXR) au niveau de l'extrémité N-terminale qui est un site de clivage par une furine convertase dans le réseau trans-golgien (*TGN : Trans-Golgi Network*) [483, 488]. Ce clivage est important dans la liaison de la sortiline avec la NTS. La partie intracellulaire est très courte et ne possède pas de site catalytique connu, mais comporte un motif hexa-peptidique (F/Y)ENTL(F/Y) d'internalisation [152, 494, 495]. La partie extracellulaire peut également être clivée par TACE (*Tumor Necrosis Factor α -Converting Enzyme*), ce clivage semblant être faible dans les modèles de cellules transfectées et de mécanisme ligand-indépendant [496]. Le clivage du domaine extracellulaire de la sortiline rend accessible la partie intracellulaire juxta membranaire à l'action des α - et γ -sécrétases, la fonction biologique du clivage du domaine intracellulaire de cette protéine restant pour l'instant non connue, que ce soit après liaison de NTSR3 à la NTS ou des pro-neurotrophines à l'hétérodimère sortiline-p75^{NTR} [496-499].

En revanche, l'interaction de la sortiline avec des β -sécrétases facilite les voies de transports rétrogrades (voies sécrétoires), médiées par l'enzyme BACE1 (*β -site β -amyloid precursor protein (APP)-cleaving enzyme 1*) ; le clivage de la partie intracellulaire de la sortiline induit une relocalisation de BACE1 du TGN vers l'endosome, induisant une diminution du trafic de BACE1, et donc de la voie sécrétoire [500]. Dans ce même travail, Finan et son équipe ont démontré que la sortiline tronquée pour la partie intracellulaire reste liée à BACE1 de façon prolongée, induisant sa séquestration dans l'endosome [500].

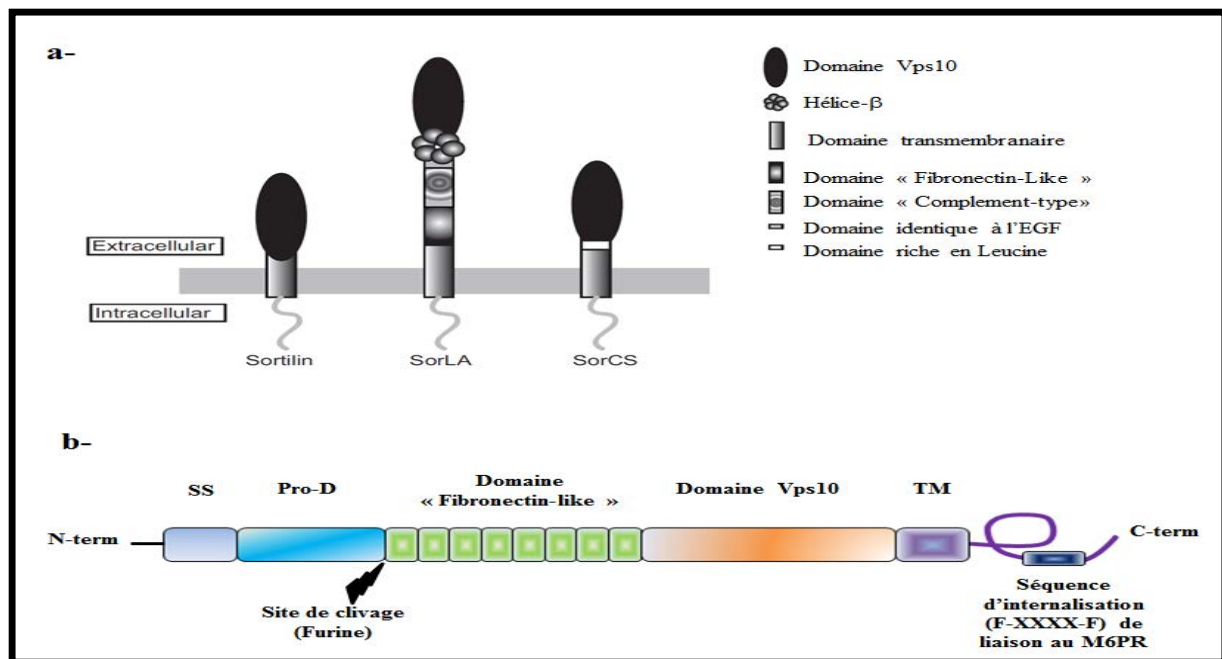


Figure 17: Illustration schématique des structures protéiques des membres de la famille des protéines à domaine Vps10, la Sortiline/NTSR3 (d'après Mazella et al.2001 ; Paiardini et al. 2008 & Wilson et al. 2014) [488, 489, 501]).

Les protéines de la famille Vps10 (Sortilin, SorLA (*Sorting protein-related receptor with A-type repeats*), SorCS1, 2 et 3 (*Sortilin-related receptor CNS expressed 1, 2 and 3*) sont des récepteurs transmembranaires. Du côté N-terminal, la partie extracellulaire comporte le domaine Vps10 commun à tous les membres de cette famille. La partie intracellulaire est plus courte. Du côté N-terminal, elle comporte une séquence signal (SS) et un pro-domaine (Pro-D), qui est clivé dans TGN (Trans-Golgi Network) par des furines intracellulaires. Le domaine extracellulaire de la sortiline est constitué d'un domaine "fibronectin-like" et d'une séquence homologue propre à cette famille de protéine, le domaine Vps10. La partie transmembranaire (TM) délimite un court domaine intracellulaire qui comporte une séquence consensus hexapeptidique (F-XXXX-F) indispensable à l'internalisation et de liaison avec le récepteur endosomal M6-PR (*Mannose 6-Phosphate Receptor*).

- **Sortiline : co-récepteur membranaire :**

La sortiline/NTSR-3 peut également avoir un rôle de récepteur membranaire, sa localisation à la membrane plasmique ne présentant qu'une fraction de son activité (moins de 10%) [165]. Elle est par ailleurs associée, comme précisé au chapitre précédent, à plusieurs autres récepteurs membranaires, comme les récepteurs aux neurotrophines Trks [165] et p75^{NTR} [154, 155].

Il est ainsi admis que les pro-neurotrophines induisent la mort des cellules neuronales *via* l'activation du complexe sortiline/p75^{NTR} [10, 155]. De façon intéressante, la survie cellulaire des cellules neuronales est restaurée par de la NTS [164]. De même, le proBDNF induit également la mort des cellules neuronales *via* l'activation de l'hétérodimère sortiline/p75^{NTR}. Au niveau neuronal, la NTS est également capable de contrecarrer l'effet apoptotique induit par le pro-BDNF [154]; en effet la NTS exogène diminue l'apoptose neuronale par compétition d'affinité, en empêchant la fixation du pro-BDNF sur l'hétéro-dimère p75^{NTR}-sortiline [154].

La sortiline/NTSR3, par sa fonction de récepteur à la NTS, peut induire un signal de survie cellulaire au sein du système nerveux central mais également du pancréas exocrine. La sortiline contribue à la mise en place de mécanismes de survie des cellules du pancréas endocrine, notamment par la formation d'un complexe fonctionnel au niveau de la membrane plasmique, NTSR2/NTSR3 (NTSR2/Sortiline) [464]. Les travaux de Del-Ferra et ses collaborateurs ont montré que la NTS pouvait également induire la prolifération cellulaire dans le modèle de cellules CHO transfectées par le vecteur d'expression humain de la sortiline [502]. La NTS peut également induire la migration de cellules microgliales humaines C13NJ par sa liaison à la sortiline [503]. Cette dernière active les voies de survies PI3-Kinases/Akt et des MAP-Kinases [503].

- **Régulation de la localisation cellulaire de la sortiline :**

L'expression de la sortiline ainsi que sa localisation cellulaire sont finement régulées. L'une des études de l'équipe de Mazella a montré que le traitement de cellules neuronales par de la NTS induisait la relocalisation à la membrane plasmique de la sortiline [504]. Toutefois, les mécanismes régissant cette régulation ne sont pas tous connus [504]. L'un d'eux fait intervenir une protéine chaperonne, la NRH-2 (*Neurotrophin Receptor Homolog-2*) qui compte des domaines transmembranaires et intracellulaires homologues de ceux du récepteur p75^{NTR}, et diffère de ce dernier par l'absence de motifs riches en cystéine au niveau extra-cellulaire [505, 506]. Chez l'homme, NRH-2 est exprimé au niveau de populations neuronales co-exprimant TrkA et p75^{NTR}. Si NRH-2 est incapable de se lier au NGF, en revanche son hétérodimérisation avec TrkA augmente l'affinité de ce dernier pour le NGF [507]. NRH-2 est également capable d'interagir avec le domaine

intracellulaire de la sortiline et de la stabiliser à la membrane plasmique, empêchant son internalisation et sa dégradation lysosomale. NRH-2 permet ainsi de maintenir à la membrane un complexe p75^{NTR}-sortiline stable, les cellules neuronales NRH-2^{-/-} étant insensibles à l'apoptose induite par les pro-NTs [508].

- **Autres fonctions cellulaires de la sortiline :**

La sortiline est également associée au trafic des vésicules de transport du glucose Glut-4 (*Glucose transporter type-4*) dans les cellules adipeuses et les cellules musculaires murines en réponse aux stimuli de régulation par l'insuline [509, 510]. De plus, la sortiline semble impliquée également dans la myogenèse [510]. La sortiline est également un des récepteurs de la lipoprotéine lipase (LpL) [511] ainsi que de la SAP (*Sphingolipid Activator Protein*) et est impliquée dans le transport intracellulaire post-golgien de ces différentes protéines [512].

La sortiline pourrait ainsi être impliquée dans le diabète [513] et les maladies cardiovasculaires [514].

L'implication de la sortiline dans différentes pathologies chez l'Homme est détaillée dans la revue en **Annexe I**.

5. Neurotensine (NTS) et système immunitaire:

5.1. Neurotensine et lymphocytes T :

Les données concernant NTS et système immunitaire restent parcellaires ; les premiers travaux datent des années 80 avec la mise en évidence d'une régulation négative de l'efflux extra-ganglionnaire des lymphocytes T par la NTS démontrée par perfusion de ganglions lymphatiques poplités par ce neuropeptide [515]. Dans la décennie suivante, les travaux ont démontré la présence des récepteurs à la NTS au niveau des lymphocytes T circulants ainsi que de diverses lignées T (Cou-L, Molt-4, Jurkat) [516-519] ; La NTS est ainsi capable de lier les récepteurs NTSRs présents dans les lymphocytes T naïfs et activés [519, 520].

De façon intéressante, la NTS inhibe la prolifération des cellules lymphomateuses issues de lymphome de Sezary ainsi que la prolifération des lignées lymphocytaires T Cou-L-T stimulées par de l'IL-2 (Interleukine-2). Par contre, la NTS

augmente la capacité de migration et de chimiotactisme de ces cellules tumorales [519, 520].

Chez la souris, la NTS est capable d'entraîner l'adhérence et la migration de lymphocytes péritonéaux *via* un mécanisme contrôlé par le calcium intracellulaire [516]. Chez le rat, elle amplifie l'effet mitogénique de la phytohémagglutinine (PHA) sur les lymphocytes T ganglionnaires [516]. Par ailleurs, la NTS et ses récepteurs sont exprimés dans le thymus du rat [521], du poulet [522, 523] et chez l'Homme [524, 525].

5.2. Neurotensine et cytokines pro-inflammatoires :

La NTS peut également moduler la production de cytokines pro-inflammatoires dans différents modèles inflammatoires ou néoplasiques. Le traitement de cellules épithéliales coliques par de la neurotensine stimule la production de l'IL-8 et favorise une réponse pro-inflammatoire *via* l'activation de la voie des MAP-Kinases [526-528]. La production de cytokines pro-inflammatoires, particulièrement de l'IL-8, est également observée chez des cellules pancréatiques néoplasiques humaines après traitement par la NTS [529]. Chez les souris, l'induction de colites par du TBNS (*Acide 2, 4, 6-Trinitro-Benzène Sulfonique*) induit une augmentation de l'expression de la NTS et de l'expression du récepteur NTSR1, conduisant à l'augmentation de la production de l'IL-6. Par ailleurs, les souris KO NTS présentent moins d'induction de colites après traitement au TBNS, et une diminution importante de la réponse pro-inflammatoire [530]. Cette diminution de la réponse pro-inflammatoire est également observée après traitement avec l'antagoniste de NTSR1, le SR48692 (Meclintant®). Ces travaux sur des modèles de colites inflammatoires murines ont permis de démontrer également que l'induction de la production de l'IL-6 par les adipocytes était médiée par l'activation de la voie de la PKC δ et du facteur de transcription NF- κ B [530].

5. 3. Neurotensine et cellules mastocytaires

Toujours au niveau du système digestif, la NTS peut également agir, *via* NTSR1, sur les mastocytes du jéjunum chez l'Homme et chez le rat et induire leurs dégranulations [521, 531]. La stimulation de cellules mastocytaires par de la NTS participe également à la production de l'histamine [521]. Ces données *in vitro*

concernant l'implication de la NTS sur l'activation et la dégranulation des mastocytes sont renforcées par la constatation de concentrations sériques élevées de NTS chez les patients atteints de dermatite atopique, pathologie au cours de laquelle l'expression cutanée de NTS apparaît corrélée à la gravité des lésions. [532, 533].

5.4. Neurotensine, cellules dendritiques et cellules phagocytaires :

Le prétraitement par de la NTS est capable de bloquer la production de cytokines pro-inflammatoires générée par du LPS (*Lipopolysaccharide*) dans les cellules dendritiques de la peau, cellules qui expriment NTSR1 et NTSR3 [534]. Il a été également montré que la NTS et la neuromedine-N (NN) sont capables de stimuler la phagocytose des macrophages péritonéaux chez la souris [535]. La NTS est également capable de moduler la capacité de phagocytose ainsi que la capacité migratoire des polynucléaires neutrophiles [536].

6. Sortiline et système immunitaire :

La sortiline est exprimée par plusieurs tissus et cellules du système immunitaire et joue un rôle important dans plusieurs processus de régulation de la réponse immunitaire.

Son expression par les macrophages a été initialement décrite dans le système nerveux central dans les cellules microgliales murines et humaines qui n'expriment pas les deux autres récepteurs de la neurotensine, NTSR1 et NTSR2. Le traitement d'une lignée de cellules microgliales humaines par la NTS induit leur migration et une signalisation intracellulaire, activant les voies de la PI3-Kinase et des MAP-Kinases [503] ainsi que l'expression de différents gènes de cytokines et de chimiokines, tels que MIP-2 (*Macrophage Inflammatory Protein-2*), MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein-1*), IL-1 (Interleukine-1) et TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) [537, 538].

La fonction de la sortiline a également été caractérisée au niveau des macrophages périphériques lors d'infections bactériennes au cours desquelles elle est surexprimée. Elle joue un rôle majeur dans la dégradation des pathogènes, l'apprêtement des antigènes, leur internalisation dans les phagosomes et leur

maturation, ces mécanismes étant importants dans la présentation de l'antigène pour la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. Ces processus impliquent des enzymes telles que la sphingomyélinase acide et la prosaposine, dont le transport de l'appareil de Golgi vers le phagosome est assuré par la sortiline [539, 540].

Par ailleurs, la fonction de la sortiline dans les macrophages intervient également dans la formation des plaques d'athérome [541]. Ainsi, une étude récente a montré, dans un modèle murin inactivé pour la sortiline, que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-6 (Interleukine-6) et INF- γ (Interferon- γ) par les macrophages et les lymphocytes Th1 était diminuée. Ces cytokines sont connues pour participer à la formation de plaques d'athérosclérose [542]. Une autre étude récente a montré que la sortiline intervient dans la maladie athéromateuse par un autre mécanisme. En effet, elle joue un rôle important dans l'absorption du cholestérol-LDL par les macrophages qui induisent les lésions pro-inflammatoires de l'athérosclérose. Dans un modèle murin athéromateux, la reconstitution de chimères hématopoïétiques comportant des macrophages inactivés pour la sortiline induit un effet protecteur contre la formation des lésions d'athérosclérose, grâce à la diminution de la recapture et de l'absorption du cholestérol-LDL [543].

La sortiline est également exprimée par les cellules NK (*Natural Killer*) et les lymphocytes T cytotoxiques. Associée au récepteur p75^{NTR}, la sortiline induit la mort des cellules NK lors de son activation par une pro-neurotrophine, le pro-NGF [240]. L'étude du système immunitaire de souris inactivées pour le gène de la sortiline (*Sort1*^{-/-}) a montré que la sécrétion de vésicules lysosomales, contenant du Granzyme A, par les lymphocytes T cytotoxiques ainsi que par les cellules NK était augmentée, et s'accompagnait d'une activation de la cytotoxicité dans des modèles de cytolysse allogénique. Ce relargage de Granzyme A pourrait être associé à l'absence de rétrocontrôle de la sortiline sur l'expression de la protéine VAMP7 (*Vesicle-Associated Membrane Protein-7*), potentiellement dû à un défaut de sa dégradation protéolytique. Ainsi cette protéine, connue pour favoriser la fusion des vésicules, favorise la sécrétion de lysosomes contenant le Granzyme A par les endosomes tardifs et ainsi augmente l'activité cytolytique.

De plus, la sécrétion d'INF- γ était considérablement réduite au niveau des LT cytotoxiques activés, de même qu'au niveau des LTh1 et des lymphocytes NK, à l'inverse de celle du TNF- α qui était similaire à celle des contrôles (*Sort1*^{+/+}). L'analyse du trafic intracellulaire dans les différents compartiments cellulaires a montré une rétention de l'INF- γ dans le réseau trans-golgien, et son accumulation dans l'endosome précoce [544], la sortiline étant nécessaire à sa sécrétion. Les différences observées avec la sécrétion de TNF- α qui n'est pas modifiée par l'inactivation de la sortiline, suggèrent que les voies de sécrétion de ces deux cytokines sont différentes [544]. Ainsi, la fonction de la sortiline apparaît essentielle dans la régulation des effecteurs immunitaires cellulaires.

L'expression de la sortiline par les lymphocytes B a été mise en évidence pour la première fois au sein de notre laboratoire [11]. Par sa fonction de transporteur de facteurs de croissance neurotrophiques, elle intervient dans la mise en place d'une boucle autocrine de survie des lymphocytes B. Ceci a été démontré au niveau de plusieurs lignées lymphocytaires B humaines de différents stades de maturation, en condition de stress apoptotique (privation sérique, activation du récepteur Fas). Par ailleurs, son expression membranaire, associée à p75^{NTR}, induit l'apoptose lymphocytaire B en présence d'une pro-neurotrophine, le pro-BDNF. La sortiline joue ainsi un rôle pivot dans l'homéostasie lymphocytaire B [11, 200].

La sortiline intervient également dans le contrôle de l'activation d'une cytokine, le CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*). Cette cytokine possède des récepteurs appartenant à la famille des récepteurs de type I, tels que le récepteur à l'Interleukine-6 et -11, le LIF (*Leukemia Inhibitor Factor*) et l'Oncostatine M (OSM) ayant une sous-unité commune, gp130, caractéristique de la famille des récepteurs de l'IL6. Ces cytokines et leurs récepteurs jouent un rôle primordial dans plusieurs processus physiologiques (comme la régulation de la réponse immune et la défense anti-infectieuse, la régulation de la croissance et survie neuronale, la reproduction et le contrôle de la prise alimentaire) et pathologiques (tels que l'inflammation, les maladies auto-immunes, les maladies neurodégénératives, la croissance tumorale) [545]

La signalisation du CNTF dépend d'un récepteur hétérodimérique, constitué de la sous unité CNTFR α (*CNTFR-Receptor- α*) qui active le complexe gp130/LIFR β , via l'activation de la voie STAT-3 [546]. La fonction de la sortiline est associée à sa liaison à la sous-unité LIFR β qui induit l'activation du complexe gp130/LIFR β [546]. Cette fonction est décrite pour la signalisation de cytokines activant le complexe gp130/LIFR β et non pour celle de l'IL-6 (dont le récepteur est homodimérique).

Le rôle de la sortiline dans les pathologies allergiques ou dysimmunes a cependant peu été étudié ; une seule étude émanant de notre laboratoire a démontré que la sortiline était surexprimée dans des biopsie d'artères temporales issues de patients atteints d'artérite à cellules géantes (Maladie de Horton), une artérite inflammatoire qui est caractérisée par une dérégulation de la réponse inflammatoire [547].

7. Neurotensine et Cancer :

De nombreuses études mettent l'accent sur l'implication de la NTS dans la résistance à l'apoptose et la carcinogénèse des cellules issues de cancers solides mais ces propriétés n'ont que peu été étudiées au niveau de lignées ou d'hémopathies lymphocytaires B.

Les premières corrélations entre l'expression de la NTS et la carcinogénèse remontent à 1980. La surexpression de ce neuropeptide est ainsi démontrée dans des tumeurs pancréatiques et des cancers médullaires thyroïdiens de rat [548-550]; son rôle de facteur de croissance cellulaire est parallèlement mis en évidence dans différents cancer solides, carcinomes folliculaires thyroïdiens [551], adénocarcinomes coliques [552-555], cancers du poumon à petites cellules [556, 557], tumeur carcinoïde et neuroendocrine [558], hépato-carcinome [559], ou encore cancers de la prostate [560, 561].

7. 1. NTSR1 et Cancer:

Le rôle de la neurotensine dans l'oncogénèse et l'évolution tumorale a été associée essentiellement au récepteur NTSR1, lequel est retrouvé dans plusieurs modèles de cancer solides [431, 562, 563] et pourrait constituer un bio-marqueur potentiel de progression tumorale dans les cancers humains [562, 564].

La contribution du complexe NTS/NTSR1 dans la stimulation de la croissance tumorale a été rapportée dans plusieurs études, notamment grâce à l'utilisation des antagonistes spécifiques du récepteur NTSR1, le SR48692, mais aussi par l'antagoniste des NTSRs, le SR142948A dans des lignées d'adénocarcinomes pancréatiques ou des modèles de xénogreffes de cancer colique [411, 565-567].

Ainsi, une diminution d'au moins 50% du volume de la tumeur a été observée dans des xénogreffes de cellules d'adénocarcinomes coliques (lignée SW480) et de cancer du poumon à petites cellules, lorsque les animaux ont été traités tous les jours avec un antagoniste de NTSR1 [566, 568].

7.1. a. NTSR1 et cancer colique :

Le récepteur NTSR1 est surexprimé dans plus de 25% des cancers de colon chez l'Homme et joue un rôle majeur dans la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses coliques [569]. Il a ainsi été démontré que la stimulation de l'axe NTS/NTSR1 avait un rôle prépondérant dans les stades les plus précoces de la cancérogenèse intestinale [554, 566, 569, 570] : NTSR1 participe ainsi à l'apparition des lésions pré-cancéreuses des cryptes intestinales (adénomes) dans un modèle de cancer colique sporadique murin dans lequel l'inactivation de NTSR1 divise par 2 le nombre de lésions précancéreuses [571].

Bakirtzi et ses collaborateurs ont montré que le stade de la tumeur colique était corrélé, chez l'homme, au degré d'expression du récepteur NTSR1. Préalablement, ils ont également démontré dans un modèle murin que cette progression tumorale était associée à la surexpression de deux microARNs (miRNAs ou miRs), miR-21 et miR-155, qui ciblent et bloquent trois principaux médiateurs de l'activation de l'axe NTS/NTSR1; PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), PPP2CA (*Protein Phosphatase-2, Catalytic subunit, Alpha isozyme*) et SOCS1 (*Suppressor Of Cytokine Signaling-1*). La NTS, *via* NTSR1, stimule l'expression de ces deux miRNAs, levant l'inhibition sur les facteurs Akt et NF-KB, induisant une croissance tumorale [572].

L'expression transcriptionnelle de NTSR1, très faiblement détectée par hybridation *in situ* au niveau de la muqueuse colique saine, augmente au sein des lésions d'adénomes et apparaît la plus importante au niveau des lésions d'adénocarcinomes coliques sporadiques [573, 574]. L'expression de NTSR1 est

également augmentée en immunofluorescence au niveau de biopsies coliques de patients atteints de colites inflammatoires en comparaison à des muqueuses coliques saines où elle n'est pas détectable ; cette expression de NTSR1 apparaît plus importante dans des lésions dysplasiques de haut grade ainsi qu'au sein de cancers coliques associés aux MICI [573, 574].

In vitro, NTSR1 favorise également la migration des lignées de cancer colorectal HT-29 et SW-490. Ces processus sont bloqués lors d'un traitement avec l'antagoniste SR48692 [575]. Il a été parallèlement démontré, au niveau de la lignée de cancer colique HTC116, que la neurotensine, *via* sa liaison à NTSR1, favorisait la production d'IL-8 par les cellules tumorales. La NTS active dans ces cellules la PKC, ERK et NF-κB, l'activation de ce facteur de transcription et la production d'IL-8 étant inhibée par la curcumine, un inhibiteur du protéasome dans ce modèle [576]

7. 1. b. NTSR1 et autres adénocarcinomes :

NTSR1 faiblement exprimé dans les cellules saines du pancréas, de la prostate, du poumon, de l'utérus et du sein, est surexprimé dans les lignées cancéreuses issues de ces mêmes tissus [392, 395, 463, 577, 578]. L'axe NTS/NTSR1 assure ainsi un rôle prédominant dans la transduction des signaux de survie, la croissance et prolifération de ces cellules cancéreuses [431, 569].

L'axe NTS/NTSR1 est associé à la croissance, la survie et la progression tumorale des lignées de cancer du sein [381, 564, 579, 580]. Le récepteur NTSR1 est retrouvé dans la majorité des tumeurs invasives et, dans 30 à 35% des cas, est co-exprimé avec la neurotensine [381, 564, 579, 580]. Le risque de mortalité est corrélé avec le niveau d'expression du récepteur NTSR1, ce qui le classe comme facteur de mauvais pronostic du cancer mammaire [580].

L'implication de NTSR-1 dans le cancer de l'utérus a également été démontrée, avec une surexpression du récepteur NTSR1 dans les lignées cancéreuses comparativement aux cellules saines. L'apport de stéroïdes favorise la croissance tumorale en augmentant l'expression de la NTS et de NTSR1 dans ces cellules cancéreuses utérines [395].

NTSR1 est exprimé normalement dans les tissus sains de pancréas et cette expression est 3 à 4 fois plus importante dans les tissus cancéreux [392]. Plusieurs, études à la fois *in vitro* et *in vivo* ont démontré que la NTS favorisait la prolifération des lignées d'adénocarcinomes pancréatiques PANC-1 et MIA-PaCa-2 *via* l'activation de la PKC et de la voie Erk, cette prolifération étant bloquée par le SR48692 [392, 581-585]. En parallèle, d'autres travaux ont révélé que le récepteur NTSR1 est surexprimé dans 75% des adénocarcinomes pancréatiques [427, 586, 587]. L'expression transcriptionnelle de NTSR1, augmentée au sein des adénocarcinomes avancés de stades 3 et 4, est en revanche non modifiée par la dédifférenciation de ces cellules tumorales. Les travaux de Wang et son équipe ont montré que le récepteur NTSR1 était également exprimé dans ces cellules, et que l'axe NTS/NTSR1 favorisait une voie de survie autocrine qui passe par la production et la sécrétion de la NTS [392, 581, 588]. De plus, la NTS apportée par le microenvironnement tumoral peut agir sur les cellules cancéreuses pancréatiques exprimant NTSR1, *via* un mode paracrine [581].

NTSR1 est également impliqué dans le cancer de prostate. L'activation de NTSR-1 dans la lignée PC-3 conduit à la prolifération cellulaire, cet effet étant bloqué par l'inhibiteur de NTSR1, SR48692 [419, 589]. Le traitement par cet antagoniste sensibilise cette lignée radio-sensible à la radiothérapie [590, 591]. Il a également été démontré dans cette même lignée qu'une privation en androgènes conduit à une surexpression de NTSR1 et de NTS qui permet d'assurer leur survie autocrine [561, 592]. Par ailleurs, l'expression de NTSR1 varie selon le stade de différenciation tumorale, cette expression étant plus importante dans les adénocarcinomes qu'au sein des adénomes prostatiques [578].

Les effets de la neurotensine sur la croissance des cellules d'adénocarcinome du poudon ont été mis en évidence dès 1992 [593, 594]. Toutefois, de hauts niveaux d'expression de la NTS par des cellules de cancer à petites cellules ont été observés bien plus tôt par Moody et son équipe [556].

L'expression du récepteur NTSR1 et de son ligand la NTS, étudiée chez 76 patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires de stade 1, est mise en évidence par immunohistochimie dans près de 60% des cas [577]. En analyse multivariée,

seul l'âge et la co-expression de NTS/NTSR1 sont des facteurs indépendants de décès à 5 ans [577]. Ces résultats ont conduit Alifano et son équipe à étudier l'implication de la NTS dans la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe d'adénocarcinome chez la souris. La stimulation de l'axe NTS/NTSR1 augmente la croissance de la tumeur primitive et favorise l'extension des métastases ganglionnaires [577]. Parallèlement, seules les xénogreffes exprimant NTS et NTSR1 ont une réponse thérapeutique à l'erlotinib (un inhibiteur de l'EGFR utilisé en thérapeutique humaine), alors que les tumeurs n'exprimant pas NTSR1 n'ont pas de réponse [431, 595]

L'expression de NTSR1 et de son ligand au niveau de la tumeur peut ainsi être considéré comme un bio-marqueur potentiel de la progression tumorale [431, 595]. L'antagoniste SR48692 augmente également l'effet cytotoxique induit par des molécules chimiothérapeutiques dans différents modèles d'adénocarcinomes pulmonaires *in vitro* et *in vivo* [596, 597].

L'expression de NTS et NTSR1 en immunohistochimie retrouvée respectivement chez 71 et 90% patients atteints de mésothéliomes, est associée à une diminution de la survie à 60 mois [598]. Ces données sont corroborées, *in vitro*, le blocage de NTSR1 par le SR48692 diminuant la survie et la migration de la lignée de mésothéliome MSTO-211 [598].

7. 2. NTSR2 et Cancer :

Le récepteur NTSR2, de par son statut de récepteur de faible affinité à la NTS, a fait l'objet de très peu d'études dans le domaine de la cancérologie. Contrairement aux récepteurs NTSR1 et sortiline, son expression reste faible dans les modèles et les lignées cellulaires cancéreuses [460, 578, 599]. Ainsi, les études en immunohistochimie n'ont retrouvé son expression que dans 40% des cancers coliques, 20% des cancers du sein [460, 578, 599]. Alors que ce récepteur est largement exprimé dans le tissu sain, où il est impliqué dans la régulation de la sécrétion post-prandiale d'acide gastrique, il n'est retrouvé que dans moins de 15% des adénocarcinomes gastriques [460, 578, 599]. Il n'est que peu ou pas retrouvé au

sein des cancers pancréatiques [460, 578, 599]. Il n'est, par ailleurs, peu exprimé au niveau transcriptionnel dans la lignée de cancer colique HT29 [460, 599].

Le récepteur NTSR2 est surexprimé dans les lignées cellulaires tumorales prostatiques différenciées exprimant les récepteurs aux androgènes ainsi que par les tumeurs prostatiques différenciées comparativement à des cellules non cancéreuses et à des tissus tumoraux non différenciés [578]. Par ailleurs, il a été également observé que le récepteur NTSR2 pouvait s'associer au récepteur NTSR1 dans des cellules prostatiques, modulant la distribution mais aussi le trafic intracellulaire du récepteur NTSR1, régulant par conséquent sa localisation et/ou son activité [600, 601].

Toutefois, en l'absence de modèle d'étude, notamment de cellules cancéreuses sur-exprimant le récepteur NTSR2, il reste difficile d'établir son rôle précis dans la cancérogenèse.

7. 3. NTSR-3/Sortiline et Cancer :

La sortiline a été détectée dans plusieurs lignées cancéreuses de côlon, de prostate, du sein, de mélanome et de glioblastome [444, 502, 602-604] et aurait un rôle potentiel dans leur croissance et leur prolifération. Sa présence est, dans presque toutes ces lignées, associée à celle de NTSR1 [502]. La fonction de la sortiline (NTSR3) en tant que récepteur à la NTS a été démontrée, bien que le mécanisme précis par lequel est assurée la transmission du signal ne soit pas encore complètement défini [367, 503].

Toutefois, l'implication de la sortiline dans la cancérogenèse passe notamment par les interactions avec ces différents partenaires. Dans la lignée de carcinome colique HT29, il a été démontré que la sortiline est capable de former un hétérodimère avec le récepteur NTSR1, induisant une signalisation de survie, notamment par une augmentation de l'activation des MAP-Kinases [444].

La sortiline est également capable d'initier des signaux de survie et de prolifération cellulaire *via* l'interaction avec les récepteurs aux neurotrophines. Ainsi, grâce à son association avec le récepteur TrkA (TrkA/Sortiline), la sortiline est capable par la liaison au pro-NGF, de promouvoir une signalisation de survie dans les cellules de cancer du sein et de favoriser l'invasion ganglionnaire de ces tumeurs [605].

Il a été montré, au sein de notre équipe, qu'une boucle autocrine de survie *via* l'activation de l'axe BDNF/TrkB était mise en évidence dans plusieurs lignées de cancer colique mais aussi dans des lignées lymphomateuses B [11, 603]. Cette boucle de survie est accompagnée d'une surexpression de la sortiline, qui assure le trafic et le transport du BDNF vers l'environnement extra-cellulaire en maintenant ainsi le flux de signaux de survie dans ces cellules [11, 603]. Par ailleurs, dans ces 2 modèles, l'association de la sortiline au récepteur p75^{NTR} induit un signal de mort, lié à l'activation du complexe sortiline-p75^{NTR} par des pro-neurotrophines, telles que le pro-BDNF [11, 200, 603].

L'ensemble de ces données montre que la sortiline/NTSR3 joue un rôle important dans l'homéostasie cellulaire et dans les processus physiopathologiques de la cancérogenèse.

8. Interactions NTSRs – RTK (Récepteurs à Tyrosine Kinases) :

Il est généralement admis que les récepteurs couplés aux protéines-G (RCPG) jouent un rôle crucial dans la croissance et la différenciation cellulaire, mais aussi dans les processus d'oncogenèse, notamment par l'activation des voies de signalisation des Erk-Kinases, de la p38 MAP-Kinases et des JN-Kinases [606]. Les RCPGs peuvent être également associés à des récepteurs à domaine Tyrosine Kinase (RTKs), formant une plateforme de signalisation, pouvant induire un signal de survie *via* la liaison du ligand du GPCR ou du RTK [607].

Plusieurs études ont montré que la liaison des GPCR induisait l'activation du récepteur RTK, par la phosphorylation de son domaine Tyrosine kinase [608, 609]. D'autres ont confirmé cette transactivation des RTK par l'activation d'un récepteur de la famille des RCPGs (**Figure 18**) [610, 611].

En cancérologie, l'activation/phosphorylation du récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), l'EGFR (EGF-Receptor) a été particulièrement étudiée. La transactivation de l'EGFR par des récepteurs de la famille des GPCRs a été démontrée dans plusieurs modèles [610, 612]. Mazella et son équipe ont démontré dans des modèles de cancer colorectal (lignées HT29 et HCT116) que la NTS était capable de d'induire la phosphorylation de l'EGFR dans ces cellules [613]. Ils ont ainsi mis en évidence que l'activation / phosphorylation du récepteur EGFR était

inhibée par le traitement par l'antagoniste de NTSR1, le SR48692. Le récepteur NTSR1 est ainsi capable de transactiver le récepteur EGFR dans ce modèle [613-615].

La transactivation de l'EGFR par NTSR1 a été par la suite confirmée dans le cancer du poumon et dans le cancer du sein, au sein desquels elle favorise la croissance et l'agressivité tumorale [595, 616, 617]. Le traitement par le SR48692 inhibe cette transactivation. De façon intéressante, le traitement par un inhibiteur des métalloprotéases (GM6001) induisait également une inhibition de la transactivation de l'EGFR par NTSR1 [595, 616, 617].

Lee et Chao ont démontré que les récepteurs aux neurotrophines TrkA et TrkB, pouvaient également être activés et phosphorylés, même en absence de leurs ligands [618]. Les récepteurs aux neurotrophines Trks, récepteurs à domaines Tyrosine kinases (RTKs), peuvent être également transactivés par des récepteurs couplés aux protéines-G [614]. Il a ainsi été montré que le récepteur TrkB pouvait être activé par de l'adénosine. En effet, dans les cellules neuronales, la liaison de l'adénosine à son récepteur A2A-R (*Adenosine Subtype A2a Receptor*) induit la transactivation du récepteur TrkB se traduisant par des signaux intracellulaires de survie [619, 620].

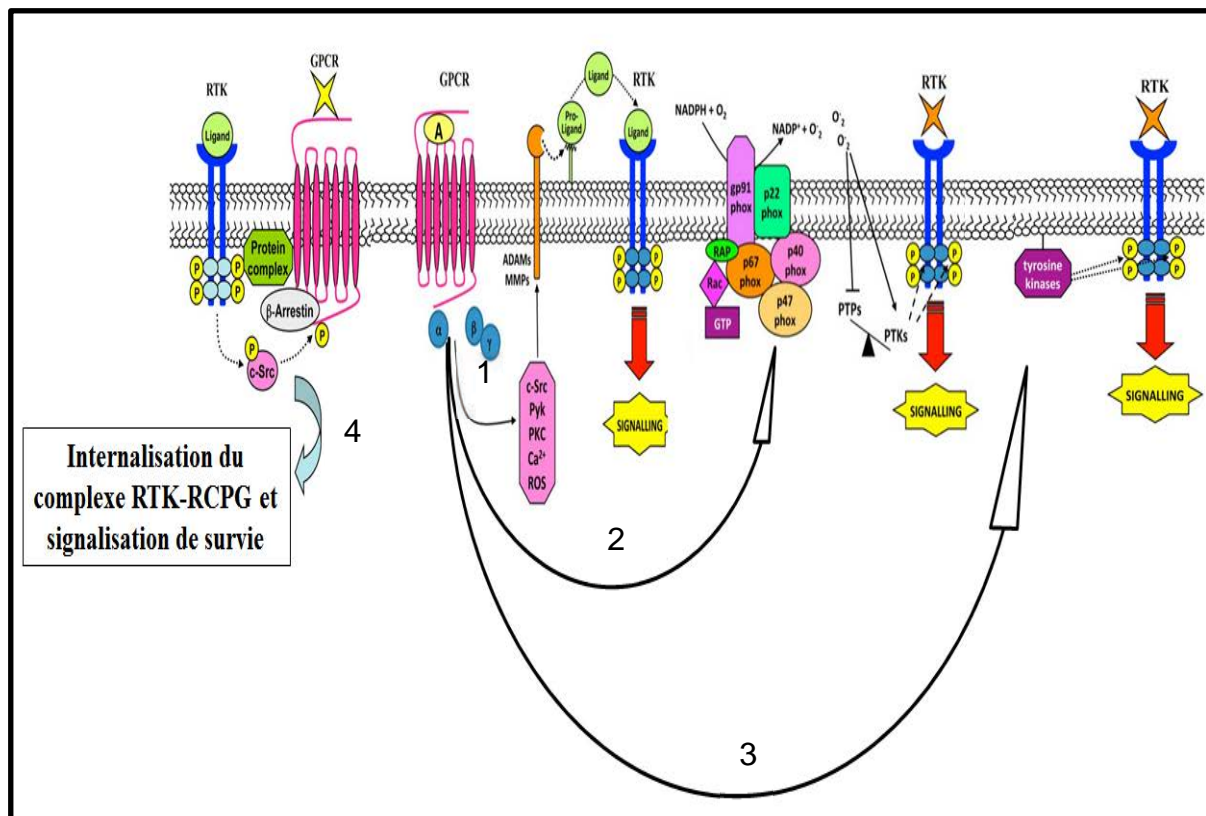


Figure 18 : Illustration schématique de l'interaction fonctionnelle entre les récepteurs RTK-RCPG (d'après Cattaneo et al. 2014)

La stimulation du récepteur couplé aux protéines-G par son ligand spécifique induit l'activation des sous-unités de la protéine-G, notamment, la sous-unité $G\alpha$, qui peut agir à différents niveaux: i)- Activer des métalloprotéases (1) qui engendrent la maturation du pro-ligand du récepteur RTK, ii)- Activer les protéines adaptatrices p47Phox (2), et par conséquent induire la réduction de la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH), produisant du NAD^+ et une espèce réactive de l'oxygène, le O_2^- . Ce dernier peut phosphoryler et donc transactiver le récepteur RTK, et la signalisation cellulaire et en résulte. iii)- Activer des protéines adaptatrices à activités Tyrosine kinases (3), qui vont directement phosphoryler le domaine Tyrosine Kinase des RTK, et induire sa transactivation et enclencher sa cascade de signalisation. Le récepteur RTK peut également, après sa liaison avec son ligand spécifique, transactiver le récepteur RCPG (4), en passant par une protéine adaptatrice, la β -Arrestine, qui active les protéines-G couplées au récepteur.

Les études menées sur l'implication du PDGFR (*Platelet Derived Growth Factor-Receptor*), un récepteur de la famille des RTKs, dans la signalisation de cellules musculaires lisses des voies aériennes, ont montré que l'activation de la voie de signalisation intracellulaire des MAP-Kinases, induite par la liaison du PDGF à son récepteur PDGFR, pouvait être initiée par la phosphorylation de protéines

adaptatrices de la familles des protéines-G, en l'occurrence Gab1 (*GRB2-associated-binding protein-1*) et Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein-2*) [621-623]. Il a été montré dans le même modèle ainsi que dans des fibroblastes de souris, que le récepteur PDGFR pouvait s'associer avec le récepteur S1P₁ (*Sphingosine 1-Phosphate-Receptor*), un récepteur couplé au protéines-G. Le complexe formé par le PDGFR-S1P₁ induisait une signalisation intracellulaire après fixation du PDGF à son récepteur. L'inhibition de l'expression du récepteur RCPG, le S1P₁, par des ARNs interférents, diminuait l'activation de la voie des MAP-Kinases induite par le traitement au PDGF [624-626].

L'activation du complexe de récepteur RTK-RCPG conduit au recrutement et à l'activation du proto-oncogène c-Src. L'activation de c-Src est régulée par les sous-unités β , γ et α de la protéine-G ; Cette dernière participe notamment au recrutement de protéines comme la β -arrestine et la dynamine-II en faveur de l'endocytose du complexe de récepteurs RTK-RCPG [607, 626-629].

Il a été également démontré, au niveau de la lignée de phéochromocytome PC12, l'existence d'un complexe actif RTK-RCPG formé par l'interaction des récepteurs TrkA et du LPA-Receptor (*Lysophosphatidate receptor*) ; le traitement conjoint de ces cellules par le NGF et le LPA induit l'activation de la voie MAPK. L'inhibition par des siRNAs de l'expression du RCPG supprime l'activation des MAPK induite par le LPA et le NGF, la surexpression du RCPG par la même technique produisant l'effet inverse [630, 631].

Rose et son équipe a également mis en exergue l'interaction de récepteurs RTKs avec les protéines-G. Elle a ainsi démontré que le récepteur TrkB-T1 (Variant tronqué du récepteur TrkB, déléetée de son domaine Tyrosine kinase), pouvait induire la libération du calcium et une signalisation intracellulaire par la fixation du BDNF, *via* le recrutement d'un RCPG non identifié. [93].

L'ensemble de ces données démontre que des interactions entre les récepteurs à Tyrosine kinases avec les RCPG peuvent résulter des plateformes de signalisation intracellulaire, complétant et/ou compensant les voies de signalisation traditionnellement étudiées. L'activation des complexes RTKs-RCPGs, semble toutefois finement régulée, notamment, par l'activation des mécanismes d'internalisation cellulaire par la β -arrestine. Celle-ci permet l'internalisation

dépendante des clathrines du complexe RTKs-RCPG dans des vésicules endosomales, puis sa dégradation par le lysosome.

III. Trafic endosomal et exosomes

1. Généralités :

L'histoire des vésicules extracellulaires débute dans les années 1970 avec l'observation par Anderson de vésicules dans des structures solides comme le cartilage. D'une taille estimée entre 30 et 1000 nm, celles-ci furent observées depuis dans différents fluides biologiques comme le sérum et le plasma [632-634], le liquide de lavage broncho-alvéolaire [635], la salive [636, 637], les urines [638, 639], le lait maternel [640], le liquide séminal [641] et les ascites d'origine tumorale [642, 643].

Ces premières observations furent cruciales et déclenchèrent un attrait pour le monde des vésicules extracellulaires marqué par des découvertes majeures tous les 10 ans. Ainsi, en 1981, Trams et ses collaborateurs ont décrit que des cellules saines ou cancéreuses sécrétaient des microvésicules d'une taille comprise entre 40 et 1000 nm de diamètre avec une organisation similaire à celle de la membrane plasmique. De plus, ces microvésicules présentaient une activité enzymatique, celle de la 5'-nucleotidase, suggérant un rôle physiologique de ces dernières [644].

Dès lors, d'autres protéines furent identifiées et notamment la transferrine qui permettra de mettre en évidence, d'une part le premier rôle physiologique des vésicules extracellulaires et d'autre part l'origine de ces mêmes vésicules. En effet, la transferrine est retrouvée enrichie au niveau des vésicules extracellulaires lors de la maturation des réticulocytes en érythrocytes. Ainsi, le premier rôle physiologique improprement attribué aux vésicules était de retirer des récepteurs présents à la surface des cellules. Cependant, l'origine de ces vésicules reste floue et partagée entre bourgeonnements de la membrane plasmique ou bien une origine intracellulaire inconnue. L'utilisation d'anticorps greffés à des billes d'or a permis de suivre l'endocytose de la transferrine jusqu'à des structures endosomales de 200 à 500 nm contenant une multitude de vésicules. Ces structures appelées endosomes multivésiculées (*MVB: Multi Vesicular Body*), présentaient une concentration remarquable des anticorps greffés dans des vésicules d'environ 50 nm. Ces endosomes multivésiculés fusionnent avec la membrane plasmique libérant leurs contenus dans le milieu extracellulaire, soit ces vésicules d'une taille comprise entre 30 et 100 nm. Pour la première fois, cette nouvelle voie de sécrétion fut décrite et donna le nom d'«*Exosomes*» aux vésicules sécrétées [645, 646]. Dès lors, une

distinction est faite entre les différentes vésicules extracellulaires, celles issues de bourgeonnements membranaires de grandes tailles et celles issues d'un trafic intracellulaire organisé.

2. Trafic endosomal et exosomes:

Le trafic intracellulaire est un ensemble de processus hautement dynamiques et fortement régulés. Les voies d'endocytose et d'exocytose font intervenir la fluidité et la dynamique de la membrane plasmique. Celle-ci est fortement sollicitée lors de l'internalisation de ligands et/ou d'autres composants cellulaires dans le cadre de leurs ré-adressage à la membrane plasmique ou de leurs propre dégradation [647, 648].

L'endosome prend naissance à partir de la membrane plasmique suite à une invagination de cette dernière. L'endosome précoce mature en un endosome tardif avec deux devenir possibles; une fusion avec un lysosome pour aboutir à la dégradation de son contenu ou une fusion avec la membrane plasmique pour libérer son contenu dans le microenvironnement [649]. Cependant, au cours de sa maturation, plusieurs invaginations de l'endosome ainsi formé aboutissent à la formation d'un endosome multivésiculé où chaque vésicule est dénommée vésicule intraluminal (ILVs). Ces mêmes ILVs constituent les exosomes une fois sécrétées. Ainsi, plusieurs molécules peuvent être présentes dans les MVBs et libérées dans le milieu extracellulaire au travers des exosomes [650-652] (**Figure 20**).

Cependant la sécrétion des exosomes semble être un mécanisme fortement contrôlé, du devenir du MVB à leur propre composition. Ce phénomène semble à l'opposé d'une libération passive d'autres vésicules extracellulaires.

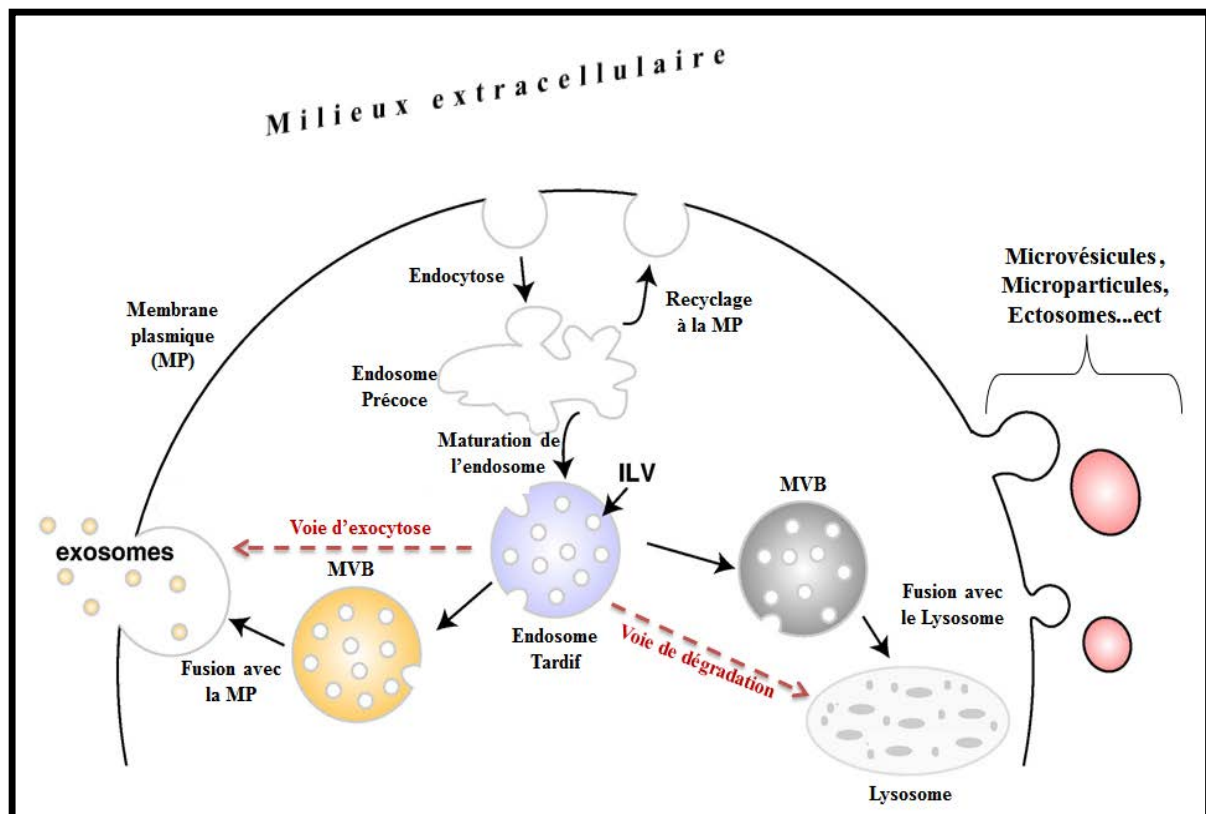


Figure 19 : Illustration schématique des devenir des vésicules endosomales après leurs internalisations (d'après Mathivanan et al. 2010 et Hanson & Cashikar. 2012 [653, 654]).

Après internalisation, les vésicules formées peuvent être recyclées à la membrane plasmique, et le contenu réexposé au milieu extracellulaire. L'endosome précoce peut subir une maturation en un endosome tardif avec une accumulation de vésicules intraluminales (ILVs) dans les endosomes ou les corps multivésiculés (MVBs). Les MVBs et leurs contenus peuvent fusionner avec le lysosome induisant leurs dégradations grâce à l'activité enzymatique lysosomale, ou alors fusionner avec la membrane plasmique, libérant leurs contenus, notamment les vésicules intra-luminales (ILVs), appelées exosomes une fois sécrétées.

3. Exosomes, composition et origine :

L'analyse de la morphologie, des contenus protéiques et lipidiques permet de distinguer les exosomes des autres microvésicules sécrétées par les cellules comme les ectosomes et les vésicules apoptotiques. Les exosomes ont une taille comprise entre 30 et 100 nm, avec une structure ronde et homogène flottant sur un gradient de sucrose à une densité comprise entre 1.13 et 1.19 g.mL⁻¹ (**Tableau II**) [655, 656].

Tableau 2 : Illustration des différences caractéristiques physiques et biochimiques des différentes vésicules extracellulaires sécrétées (*D'après Théry C. Nat. Rev. Immunol 2009 [656]*).

	Exosomes	Microvésicules	Ectosomes	Particules membranaires	« Exosomes like vesicles »	Corps apoptotiques
Taille	50-100 nm	100-1000 nm	50-200 nm	50-80 nm	20-50 nm	50-500 nm
Densité sur gradient de Sucrose	1.13-1.19 g.mL ⁻¹	Indéterminée	Indéterminée	1.04-1.07 g.mL ⁻¹	1.1 g.mL ⁻¹	1.16-1,28 g.mL ⁻¹
Ultrastructure	En forme de cupule	Dense en électrons avec une forme de cupule irrégulière	Structure bilamellaire	Rondes	Forme irrégulière	Hétérogènes
Sédimentation	100 000 g	10 000 g	160 à 200 000g	100 à 200 000g	175 000 g	1200 g, 10 000 g à 100 000 g
Composition en lipide	Enrichis en cholestérol, sphingomyéline et céramide. Présence des radeaux lipidiques. Les phosphatidyl-sérines sont exposées	Les phosphatidyl-sérines sont exposées	Enrichis en cholestérol et diacylglycérol. Les phosphatidyl-sérines sont exposées	Indéterminée	Pas de radeaux lipidiques	Non déterminée
Marqueurs protéiques	Tétraspansines (CD63, CD9), Alix et TSG101	Intégrines, Sélectines et ligand du CD40	CR1 et enzyme protéolytiques. Absence de CD63	CD133, absence de CD63	TNFR1	Histones
Origine cellulaire	Endosome	Membrane plasmique	Membrane plasmique	Membrane plasmique	Non déterminée Peut-être de compartiments intracellulaires	Non déterminée

Du fait de leur origine endosomale, les exosomes arborent à leur surface des protéines et des lipides qui les distinguent de ceux de la membrane plasmique [657]. Des protéines endosomales spécifiques sont retrouvées d'une manière enrichie dans les exosomes et servent de marqueurs pour les distinguer des autres vésicules extracellulaires ; il s'agit plus particulièrement de protéines impliquées dans les voies endocytosiques d'où sont originaires les exosomes. Ces différents marqueurs protéiques comprennent des membres de la famille des tétraspanines (CD63, CD9), des molécules impliquées dans la formation des microvésicules (Alix, Tsg101 ou *Tumor Susceptibility Gene 101*), des protéines d'adhésion (MFG-E8 ou *Milk Fat Globule-EGF factor-VIII*), des intégrines, des protéines chaperonnes (Hsc70 ou *Heat shock cognate protein-70*, Hsp90 ou *Heat shock protein-70*), des protéines des

radeaux lipidiques (Flotilline-1, Flotilline-2) ainsi que des molécules de présentation d'antigènes (CHM-I et CMH-II) [657, 658] (**Figure 20**).

La composition lipidique des exosomes est enrichie de phospholipides saturés, de cholestérol, de sphingomyéline, de gangliosides et de céramides. Ils sont également caractérisés par une forte exposition de la phosphatidylsérine à leur surface (**Figure 20**) [659].

Plusieurs acides nucléiques sont également contenus dans les exosomes notamment des ARNs messagers, des micros ARNs ainsi que d'autres ARNs non codants (**Figure 20**).

Le contenu des vésicules extracellulaires ne cesse d'être enrichie au travers de différentes analyses protéiques et sont recensés dans une base de données: <http://microvesicles.org/>.

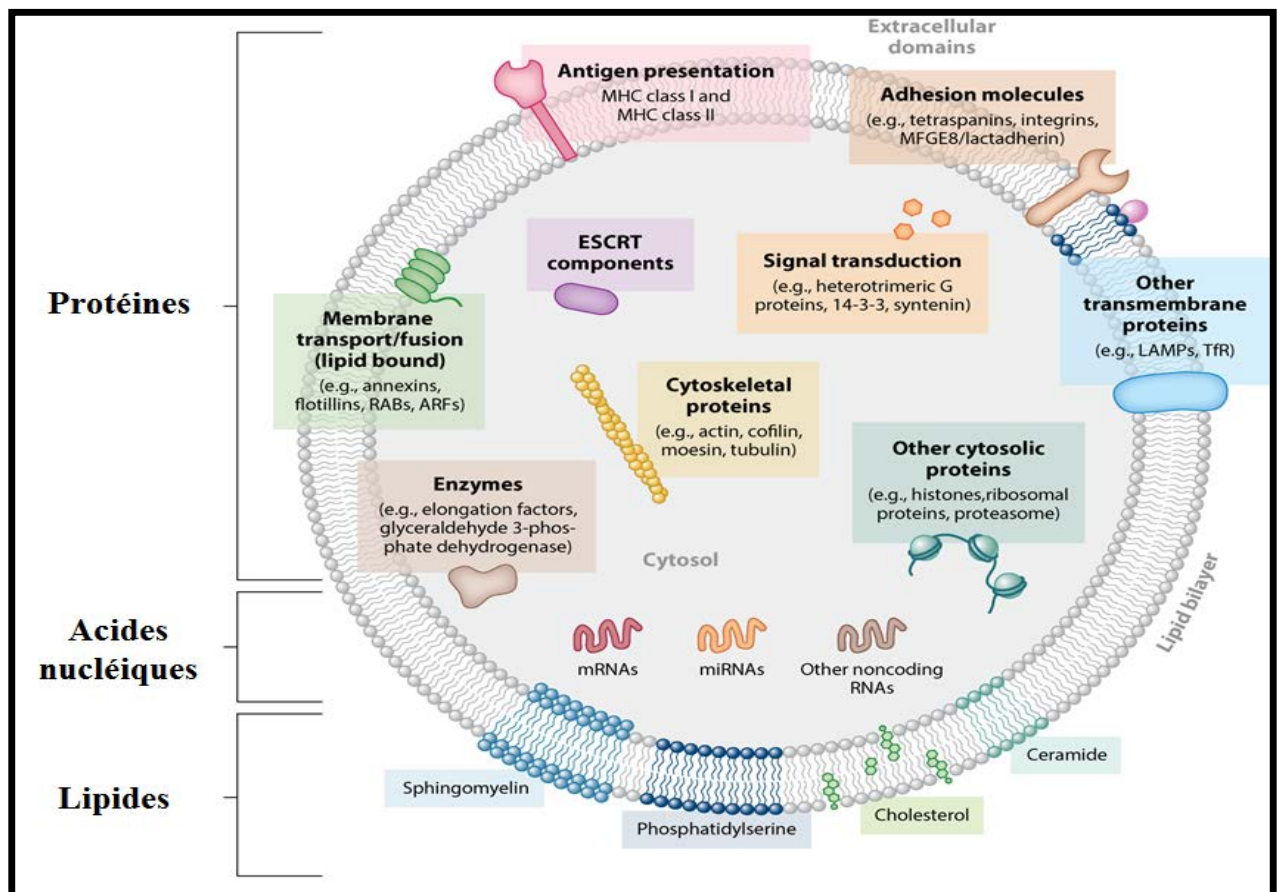


Figure 20 : Représentation schématique de la composition globale d'un exosome (d'après Colombo, 2014 [660])

De nos jours, un degré de complexité est apporté avec l'origine de la composition des exosomes et les mécanismes moléculaires intervenant dans leur

biogénèse. Plusieurs mécanismes moléculaires ont été décrits mais de nombreuses zones restent à élucider.

3. 1. Exosomes et régulation par les complexes ESCRT :

L'ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) est un complexe protéique impliqué dans l'invagination de la membrane plasmique produisant les vésicules endosomales (MVBs), leurs transports ainsi que la sélection des protéines et leurs devenir (ubiquitinylation et dégradation, intégration de vésicules d'exocytose ou autres) [661]. Par exemple, les protéines destinées à la dégradation sont mono-ubiquitinylées ou poly-ubiquitinylées par les ubiquitine-ligases. Les parties cytosoliques ubiquitinylées des récepteurs à la surface des endosomes constitueront des points d'ancrage nécessaire au recrutement des complexes ESCRT. Ces derniers vont invaginer la membrane de l'endosome vers sa lumière pour aboutir à la création des ILVs, tout en adressant des protéines spécifiques à l'intérieur de ces dernières. L'évidence de l'implication des complexes ESCRT dans la biogénèse des exosomes est confortée par la forte présence exosomale de protéines ubiquitinylées ainsi que des protéines impliquées dans la voie endocytaire telles que Alix et Tsg101 [662, 663].

Quatre complexes ESCRT de fonctions différentes sont connus, faisant intervenir des complexes protéiques différents notés : ESCRT-0, -I, -II et -III [653, 664]. Chaque complexe intervient à différent moment de la cinétique de maturation de l'endosome.

3. 1. a. ESCRT-0 :

Le complexe ESCRT-0 est le complexe le plus proche de la membrane plasmique à interagir avec la membrane endosomale. Ce dernier joue un rôle dans la génération des corps multivésiculés en se liant et en agrégeant les protéines ubiquitinylées à la surface cellulaire pour amorcer l'assemblage des complexes suivants. Il possède 5 motifs de liaison aux ubiquitines et un domaine de liaison à la phosphatidyl-Inositol-3 Phosphate (PI3P) nécessaire au recrutement de la protéine adaptatrice, la Tsg101. Il possède également un domaine de liaison à la clathrine et au domaine Sh3 (Src homology 3).

Ce complexe fait intervenir deux protéines principales, la protéine HRS (*Hepatocyte growth factor-Regulated Tyrosine kinase Substrate*), et les protéines STAM-1 et -2 (*Signal Transducing Adaptor Molecule -1 et -2*) [664-666]. La protéine HRS, est une molécule clé dans l'initiation de la formation des MVBs au travers de son interaction avec la protéine Tsg101 et le recrutement des protéines du complexe ESCRT-I [667, 668].

3. 1. b. ESCRT-I :

ESCRT-I fut le premier des complexes ESCRT décrit et associé à la formation des ILVs [664, 667, 668]. Le complexe I se forme à partir du recrutement de Tsg101 à la membrane de l'endosome par HRS. Il est composé des protéines Tsg101, Vps28 (*Vacuolar protein sorting 28 homolog*), Vps37 (*Vacuolar protein sorting 37 homolog*) et MVB12 (*Multivesicular Body sorting factor-12*) avec des domaines de liaison aux protéines du complexe ESCRT-II, notamment la protéine ALIX [669, 670]. Il participe également à la reconnaissance de la plateforme d'ubiquitines sur les protéines poly-ubiquitinylées dans le complexe ESCRT-0, et au recrutement de la protéine UBAP-1 (*Ubiquitin Associated Protein-1*) essentielle au trafic des MVBs [671] et à la stabilité des complexes formés [653, 664]. Les complexes -II et -III s'assemblent ensuite par une cascade d'interactions protéiques.

3. 1. c. ESCRT-II :

Le complexe ESCRT-II est lié aux complexes ESCRT-I et ESCRT-III. C'est un hétéro-tétramère formé d'une unité des protéines Vps36 et Vps22 étroitement liées l'une à l'autre et de deux sous-unités de la protéine Vps25 [672-674]. Chacune de ces deux sous-unités interagit avec Vps36 ou Vps22, formant une structure en « Y » (**Figure 21**), caractéristique du complexe ESCRT-II [664, 672, 675]. Il interagit ainsi avec le complexe ESCRT-I au niveau de la protéine Vps28, par le biais du domaine « Glue » de la protéine Vps36 liant les protéines ubiquitinylées. Ce domaine est également capable d'interagir avec la PI3P [664].

3. 1. d. ESCRT-III :

Le complexe ESCRT-III diffère des 3 autres complexes par sa composition unique en protéines solubles organisées en sous-unités monomériques liées entre elles sous forme de filaments. Chacune des sous-unités Vps25 du complexe ESCRT-III lie une protéine Vps20, qui initie la polymérisation des filaments formés par les protéines Snf7, Vps24 et Vps2 [674, 676, 677]. La formation des filaments induit de nombreux changements de conformation au niveau du complexe ESCRT-III entraînant la formation d'une structure membranaire à la manière d'un tapis roulant enveloppant les protéines ubiquitylées à l'intérieur ; le mécanisme induisant ces changements de conformation des protéines du complexe ESCRT formé n'est pas complètement élucidé [664]. Un complexe formé des protéines Vps2, Did2, Ist1 et Vps60, lié au filament formé par ESCRT-III, recrute la protéine Vps4 et son cofacteur Vta1 [678-680].

La protéine Vps4, possédant une activité ATPasique (AAAA-ATPase) et son cofacteur Vta1, vont induire le désassemblage de la structure du complexe ESCRT-III, induisant une scission au niveau de la membrane du MVB, formant des vésicules à l'intérieur du MVB [653, 664, 680, 681].

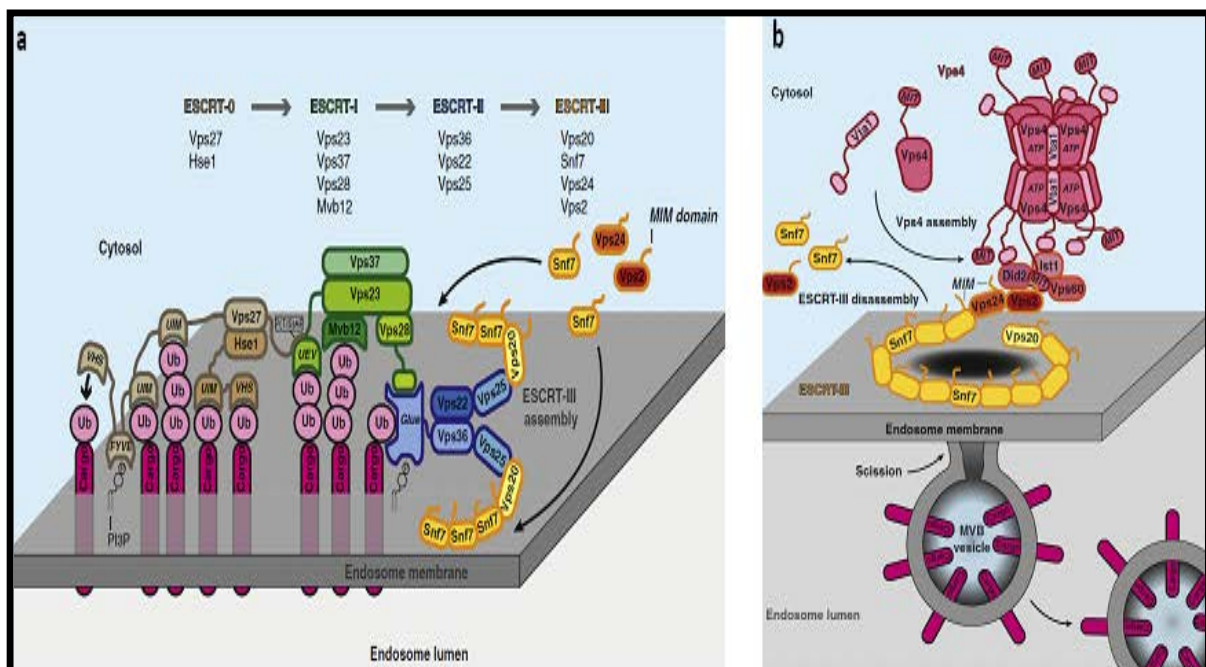


Figure 21: Illustration schématique de la structuration des complexes ESCRT, de la séparation de la vésicule de la membrane et de la formation des vésicules ILVs (*d'après Schmidt et Teis. 2012 [664]*).

- a)- Les molécules du complexe ESCRT-0 (Marron), permettent l'initiation de la formation des complexes de la voie ESCRT et à la formation des MVBs. Elles se lient à la PI3P (Phosphatidyle Inositol-3 Phosphate), et participent au regroupement des protéines ubiquitynilées, Ub. (Rose). Les molécules du complexe ESCRT-I (Vert) sont recrutées par ESCRT-0, notamment par la protéine Vps27. Le complexe ESCRT-II (Bleu), en forme de « Y », interagit *via* le domaine Glue de la protéine Vps36 avec le complexe ESCRT-I, la PI3P et les domaines ubiquitynilés. La sous-unité Vps25 sert de support au complexe ESCRT-III (Jaune et Orange), qui va séquestrer les protéines ubiquitynilées vers l'intérieur du bourgeonnement de la vésicule en formation.
- b)- Les sous-unités Vps24 and Vps2 du complexe ESCRT-III (Orange) restent localisées à la surface de l'endosome, et lient les protéines Vps2, Did2, Ist1 et Vps60 qui forment une structure complexe qui va recruter la protéine Vps4 AAA-ATPase et son cofacteur Vta1. Le complexe Vps4 formé (Rose), grâce à son activité ATPasique, catalyse la déstructuration du complexe ESCRT-III, induisant une scission de la vésicule d'environ 50 nm de diamètre chez l'Homme.

Cependant, au-delà des modifications post-traductionnelles apportées par l'Ubiquitine, l'adressage des protéines dans les ILVs pourraient être indépendante des complexes ESCRT. Certaines protéines comme la famille des tétraspanines assureraient une partie du tri des protéines à adresser aux ILVs. Par exemple, le récepteur CD63 participe à la formation des ILVs lors de la mélanogénèse indépendamment des complexes ESCRT [682].

3. 2. Exosomes et les tétraspanines:

Les tétraspanines sont des protéines transmembranaires enrichies dans les membranes des exosomes, les principales étant CD9, CD81, CD82 et CD63. Elles peuvent former des complexes à la surface des exosomes et serviraient de molécules d'adressage aux cellules cibles.

La tétraspanine CD9 favorise le chargement de la molécule du CMH-II dans les exosomes, notamment dans les cellules dendritiques activées [683]. En effet, les cellules dendritiques immatures présentent à leur surface le complexe CMH-II ubiquitynilé. Ce dernier est rapidement conduit au protéasome pour sa dégradation [683]. A l'inverse, dans les cellules dendritiques matures, le CMH-II est stabilisé après l'inhibition de son ubiquitynylation. Ainsi stabilisé, les molécules de CMH-II à la

surface membranaire peuvent induire un processus de régulation négative par leur internalisation.

La CD9 interagit avec les molécules du CMH et induit une réorientation de ces dernières vers les ILVs. Ce phénomène favorise la sécrétion du CMH exposé à la surface des exosomes et limite sa dégradation [683]. L'équipe de Chairoungdua a montré que les cellules dendritiques de souris invalidées pour la CD9 produisaient moins d'exosomes que les souris sauvages [684]. Cependant, cette observation ne semble pas s'appliquer à toutes les tétraspanines. En effet dans une lignée lymphoblastoïde EBV négative et modifiée génétiquement en cellule présentatrice d'antigène, l'invalidation par shRNA du CD63 augmente l'activation des lymphocytes T CD4+. Cette augmentation de l'activation T découle d'une amplification de l'expression des molécules du CMH-II dans les exosomes, soit du potentiel de présentation des antigènes aux lymphocytes T par les molécules du CMH [682, 685].

Cependant, la plus grande composition des exosomes est basée sur les lipides qui constituent la bicouche phospholipidique. Bien que des protéines participent activement à la formation des exosomes, les lipides demeurent indispensables.

3. 3. Exosomes et Céramides:

Les céramides sont des lipides en forme en cône, capables d'induire la torsion de la bicouche phospholipidique nécessaire à la formation des ILVs. Il a été montré que l'adressage de la protéine protéolipide (PLP) dans les exosomes était indépendant des complexes ESCRT, mais dépendait de la céramide [686]. Les travaux de Trajkovic ont ainsi démontré que la genèse des exosomes dans la lignée oligodendrocytaire Oli-neu, est dépendante de la synthèse des céramides, car l'utilisation d'un inhibiteur de la sphingomyélinase réduit considérablement la quantité d'exosomes sécrétés [686].

Par ailleurs, le contenu des exosomes peut dépendre de glyco-sphingolipides, mais aussi de protéines associées aux cargos lipidiques, telle que les flotillines-1 et -2 [687].

3. 4. Exosomes et ARNs :

Plusieurs travaux ont démontré qu'en plus d'un bagage protéique et lipidique, les exosomes pouvaient contenir des molécules d'acides nucléiques (ARN messagers [688-690] et microARNs ou miRs [691-694]). Leur incorporation dans les vésicules exosomales est également très régulée [692]. Les mécanismes moléculaires à l'origine cette incorporation ne sont pas totalement élucidés. Toutefois, des protéines des complexes ESCRT, notamment le complexe ESCRT-II, peuvent lier des ARNs [695]. Le contenu des exosomes est donc étroitement lié à la biogenèse de ces derniers (**Figure 19**).

3. 5. Sécrétion des exosomes induite par l'oligomérisation de protéines :

L'oligomérisation de certaines protéines peut conduire à une forme de protection ou de ralentissement de leur dégradation. Ces protéines tendent à se regrouper et à s'accumuler au niveau des endosomes soit à leur membrane ou dans leur lumière. Ainsi, ce phénomène stimulerait indirectement de trafic endosomal, source des ILVs et des futurs exosomes [696]. Ce mécanisme a été démontré avec l'accumulation des molécules de CMH-II dans les lymphocytes B activés et la régulation des complexes peptides-CMH-II formés [696]. Des mécanismes identiques avaient été démontrés au cours de la maturation érythrocytaire avec la transferrine [697], ainsi qu'avec la protéine membranaire CD43 dans les lymphocytes T [698]. De façon intéressante, le mutant TNFR1 du récepteur au TNF (Tumor Necrosis Factor), impliqué dans une maladie auto-inflammatoire autosomique dominante le TRAPS (*TNF receptor-associated periodic syndrome*), qui a perdu sa capacité à s'oligomériser, n'est plus retrouvé dans les exosomes, contrairement au récepteur sauvage [699].

De nombreux points restent à élucider dans la biogenèse et l'adressage spécifique de certaines protéines dans les exosomes. De nos jours, les fonctions physiologiques des exosomes depuis la découverte de l'adressage de la transferrine

nécessaire à la maturation des érythrocytes ont été complétées à la fois dans des contextes physiologiques normaux et physiopathologiques.

4. Exosomes et immunité anti-tumorale :

Il faudra attendre les années 90, pour attribuer de nouvelles fonctions biologiques aux exosomes avec les travaux de l'équipe du Professeur Graça Raposo concernant le rôle des exosomes dans l'immunité. En effet, comme décrit dans le chapitre précédent, les exosomes issus de lymphocytes B peuvent contenir les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II) [651]. Les molécules du CMH-II présentes dans les exosomes arborent une conformation de molécule compactée, différente des molécules de CMH-II présentes au niveau de la membrane plasmique, mais tout aussi capable d'induire une réponse lymphocytaire T [651]. Ces observations ont montré que les exosomes étaient capables de présenter l'antigène et d'induire une réponse immunitaire [651, 700, 701].

L'équipe du Professeur Zitvogel a confirmé par la suite la fonctionnalité des exosomes et leurs capacités à présenter les antigènes. Dans leurs travaux, ils démontrèrent que les exosomes issus des cellules dendritiques exprimaient des molécules de CMH-I et de CMH-II de même que la molécule de co-stimulation des LT, le CD86. L'injection d'exosomes issus de cellules dendritiques présentant des antigènes spécifiques de cellules cancéreuses préalablement greffées sur un modèle murin, active la réponse lymphocytaire T cytotoxique ciblant les antigènes tumoraux [702, 703]. Dès lors, les exosomes capables d'induire une immunité anti-cancéreuse représentent une nouvelle piste de thérapie anti-tumorale [704].

Les travaux du Professeur Raposo et son équipe sur l'activation des lymphocytes T par les molécules du CMH présentes dans les exosomes ont donné une nouvelle dimension à l'implication des exosomes dans la réponse immunitaire anti-tumorale [651, 700, 703]. L'équipe du Professeur Zitvogel a démontré que des cellules dendritiques (CDs) de patients atteints de cancer du poumon, pouvaient être activées *in vitro*, par des antigènes tumoraux et produire des exosomes arborant des molécules de CMH chargées de ces même antigènes. La réinjection de ces exosomes induisait une augmentation de la réponse immunitaire anti-tumorale [703-

706]. Chez les souris, ce procédé induit une réponse anti-tumorale importante, menant à l'éradication des tumeurs induites [702]. De plus, les exosomes peuvent également contenir des facteurs suppresseurs de tumeurs, tel que PTEN [707, 708].

Paradoxalement, les exosomes, utilisés par les cellules immunitaires, peuvent transporter du matériel d'origine virale. Les cellules lymphoblastoïdes B infectées par le virus EBV (Epstein Barr Virus), peuvent transporter les ARNm viraux qui codent pour les protéines de phases de latence dans les exosomes qu'elles sécrètent. Ainsi, les exosomes transmettent les caractères pathogéniques du virus [709]. Par ailleurs, cette famille de virus oncogéniques, les γ -Herpesvirus (EBV, KSHV : *Herpesviruses Kaposi Sarcoma-associated Virus*), peut également modifier le contenu des exosomes sécrétés par les cellules infectées pour modifier directement leurs microenvironnements [710]. Ainsi, les exosomes peuvent transporter un message corrompu.

Les cellules tumorales sont également capables de sécréter des exosomes. Au cours de la tumorigénèse, les besoins de la tumeur vont évoluer à la fois pour combattre un environnement qui lui est hostile et pour être considéré comme un tissu normal. En perpétuelle révolution, l'apparition de zones hypoxiques et le manque de nutriments vont obliger les cellules tumorales à communiquer avec leur environnement. Les travaux d'Al-Nedawi ont démontré le potentiel d'agressivité des exosomes en transportant des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et l'EGF (Epidermal Growth Factor) ainsi que leurs récepteurs VEGFR et EGFR à des cellules endothéliales [711-713]. Dans la continuité de ces travaux, Al-Nedawi a montré également la présence du variant III du récepteur à l'EGF (EGFR-VIII). Ce variant de l'EGFR ne possède pas de domaine extracellulaire, mais reste toutefois activé de façon constitutive et autonome, induisant une signalisation intracellulaire pro-survie. Ainsi les tumeurs peuvent contrôler leur microenvironnement tumoral, notamment au niveau de la néo-vascularisation, en agissant directement sur les cellules endothéliales *via* le partage par exosomes de récepteurs impliqués dans l'angiogénèse.

De plus, Il a été démontré au sein de notre laboratoire dans un modèle du cancer bronchique, que les exosomes issus des cellules tumorales pouvaient transporter des récepteurs à activité Tyrosine Kinase, en l'occurrence TrkB et

l'EGFR. Ces deux RTKs, sont associés avec la sortiline, une protéine à domaine Vps10, formant un complexe appelé « TES » (TrkB-EGFR-Sortiline). Ce complexe ainsi formé au niveau des cellules tumorales puis transporté *via* les exosomes au niveau des cellules endothéliales augmente jusqu'à soixante fois l'expression de protéines pro-angiogéniques [714].

Les exosomes peuvent également transporter des facteurs protéiques solubles et des facteurs de croissance et induire des voies de signalisation de survie cellulaire [715]. Le variant muté de K-Ras [716] ainsi que d'autres oncogènes [717] peuvent ainsi être partagés entre les cellules. Ainsi, l'application d'exosomes issus de la lignée de cancer gastrique SGC7901 induit l'activation d'Akt et de la PI3-Kinase au niveau d'autres lignées cellulaires [718].

Les exosomes peuvent également contenir des acides nucléiques comme des ARNm et des microARNs (miRNAs ou miRs) [691-694, 719]. Plusieurs études ont démontré l'effet de miRNA contenus dans des exosomes sur le microenvironnement tumoral. Ces derniers peuvent inhiber l'expression de protéines pro-apoptotiques ou stimuler la production de facteurs de croissance et de facteurs pro-angiogéniques. Ce phénomène a été démontré par l'équipe du Professeur Skog dans un modèle de glioblastome [693]. Les études menées sur plusieurs types de cancer révèlent l'existence exosomale de miRNAs avec un potentiel oncogénique important, induisant la prolifération et de la croissance tumorale. Ces miRs sont communément appelés « OncomiRs » [720].

Enfin, indépendamment de leur potentiel à induire des signalisations cellulaires dans des cellules qui incorporent ces derniers, les exosomes peuvent jouer le rôle de leurres pour l'immunothérapie. En effet, les exosomes arborent à leur surface des récepteurs provenant des cellules d'origine. Au même titre que des cellules, les récepteurs présents à la surface des exosomes peuvent être reconnus par les anticorps thérapeutiques. L'efficacité du traitement par le rituximab® (anti-CD20) peut être diminuée par les exosomes ayant à leur surface la protéine CD20. Cette liaison diminue la concentration d'anticorps atteignant les cellules tumorales, réduisant ainsi son efficacité dans le traitement des lymphomes. Les exosomes peuvent ainsi constituer un mécanisme de résistance aux thérapeutiques anti-tumorales [721].

Résultats

Contexte scientifique :

La neurotensine présente une large gamme d'actions biologiques, dans le système nerveux central mais aussi dans plusieurs tissus périphériques. Elle constitue également un facteur majeur impliqué dans la croissance et la progression de lignées cancer solide chez l'Homme (côlon, de la prostate, du poumon, du pancréas, du sein), notamment par l'induction de la prolifération cellulaire par sa liaison à son récepteur de haute affinité NTSR1.

Les données concernant l'implication de la neurotensine et de ces récepteurs (NTSR1 et NTSR2) dans le système immunitaire ne sont pas nombreuses. Toutefois, quelques études ont rapporté son implication dans la réponse pro-inflammatoire par son activation sur des cellules du système immunitaire, notamment, sur des mastocytes et des neutrophiles avec l'induction de production des cytokines IL-8 et IL-6 et de molécules chimiotactiques. D'autres travaux ont démontré la présence des récepteurs à la NTS au niveau des lymphocytes T circulants dans diverses lignées T (Cou-L, Molt-4, Jurkat). La NTS est ainsi capable de lier les récepteurs NTSRs présents dans les lymphocytes T naïfs ou issus de syndrome de Sezary.

Au sein de notre laboratoire, nous avons préalablement caractérisé NTSR3 (sortiline) dans les lymphocytes B humains. Dans les lignées lymphocytaire B, la sortiline présente une double fonction, de transporteur du BDNF, mais aussi de corécepteur du récepteur de mort $p75^{NTR}$, dans la liaison du pro-BDNF. Toutefois, l'expression de la neurotensine et son rôle potentiel dans les cellules B n'a pas été étudiée.

Nous avons émis l'hypothèse que la neurotensine et ses deux récepteurs spécifiques, NTSR1 et NTSR2, pourraient aussi être exprimés dans les lymphocytes B. Nous avons donc étudié l'expression de la neurotensine ainsi que de ces deux autres récepteurs NTSR1 et NTSR2, dans des lignées B humaines à différents stades de maturation. Dans un deuxième temps, les fonctions de ce neuropeptide de ces 2 récepteurs dans la survie et l'apoptose lymphocytaire B ont été étudiées dans des modèles de lymphopathies B (lignées cellulaires, leucémie lymphoïde chronique et lymphomes B).

Résultats I - Expression de la neurotensine et de ses récepteurs par les lymphocytes B humains : rôle dans l'homéostasie cellulaire

“Differential expression of neurotensin and specific receptors, NTSR1 and NTSR2, in normal and malignant human B lymphocytes”

Sofiane SAADA, Pierre MARGET, Anne-Laure FAUCHAIS, Marie-Claude LISE, Guillaume CHEMIN, Philippe SINDOU, Arnaud JACCARD, Fabrice LALLOUE, Marie-Odile JAUBERTEAU, J Immunol. 2012 Dec 1;189(11):5293-303.

“Expression de la neurotensine et de ses récepteurs, NTSR1 et NTSR2, dans les lymphocytes B humains normaux et cancéreux ”

L'expression de la neurotensine et de ses 2 récepteurs spécifiques, NTSR1 et NTSR2 a été recherchée au niveau de 6 lignées lymphocytaires B mimant les différents stades de la maturation lymphocytaire, pro-B (RS4), pré-B (Nalm6), B matures (BL2 et BL41), et plasmocytaires (U266 et RPMI 8226), de lymphocytes B circulants puis activés de donneurs sains (n=17), ainsi que dans des leucémies lymphoïdes chroniques (n=6) et des lymphomes à grandes cellules B (n=7).

Nous avons mis en évidence la présence transcriptionnelle (RT-PCR) et protéique de la neurotensine et de ces 2 récepteurs spécifiques, NTSR1 et NTSR2 au sein de différentes lignées B humaines, complétant ainsi les travaux antérieurs ayant prouvé l'expression de la sortiline, ou NTSR3, récepteur de la neurotensine mais également du BDNF et de TrkB dans ces différentes lignées [11].

Le stress pro-apoptotique induit par la privation sérique favorise l'expression membranaire de NTSR1 et de NTSR3, ces 2 récepteurs étant majoritairement séquestrés en intra-cellulaire en conditions basales de culture (*i.e.* 10% SVF).

Alors que la neurotensine ne modifie pas la prolifération des différentes lignées en conditions basales, ce neuropeptide, à l'inverse, diminue l'apoptose et augmente la prolifération des différentes lignées B soumises à un stress pro-apoptotique induit par la privation sérique combinée ou non à l'activation de Fas. Le

blocage du récepteur NTSR1 par le SR48692/Méclinertant® rétablit l'apoptose des lignées U266 et RPMI 8226, induite par la privation sérique.

Parallèlement, nous avons démontré la présence de la neurotensine et de ses récepteurs NTSR1 et NTSR2 dans les lymphocytes B circulants humains, la transcription de ce neuropeptide et de ses 2 récepteurs étant réduite après leur l'activation. Les analyses en RT-PCR quantitative ont détecté une surexpression de NTSR2 au sein des lymphocytes B purifiés de patients ayant une LLC; en revanche, l'expression de la neurotensine est réduite au niveau des ganglions de patients atteints de lymphomes B.

Ces résultats mettent en évidence l'implication potentielle de la neurotensine ainsi que de ces récepteurs dans oncogenèse B. Des résultats préliminaires montrent une surexpression d'un de ses récepteurs, NTSR2, au cours de la LLC, suggérant que la régulation fine de l'expression de ce neuropeptide et de ses récepteurs pourrait être modifiée au cours des pathologies lymphocytaires B.

L'ensemble de ces résultats sont illustrés dans **l'article 1**.

Differential Expression of Neurotensin and Specific Receptors, NTSR1 and NTSR2, in Normal and Malignant Human B Lymphocytes

Sofiane Saada,^{*,1} Pierre Marget,^{*,1} Anne-Laure Fauchais,[†] Marie-Claude Lise,^{*} Guillaume Chemin,[‡] Philippe Sindou,^{*} Clothilde Martel,[†] Laurent Delpy,[‡] Elisabeth Vidal,[†] Arnaud Jaccard,^{‡,§} Danielle Troutaud,^{*} Fabrice Lalloué,^{*} and Marie-Odile Jauberteau^{*}

Neurotensin, a neuropeptide growth factor, and its two specific neurotensin receptors, NTSR1 and NTSR2, were shown to be expressed by human B cell lines. Another NTSR, sortilin, which is common to neurotensin and neurotrophins, was also detected as we have previously described. Neurotensin was functional in B cell lines; it induced their proliferation and inhibited apoptosis induced by serum deprivation or Fas activation. Quantitative study of gene expression in two malignant B cell diseases showed that NTSR2 was overexpressed, NTSR1 decreased, and neurotensin was unexpressed in B cell leukemia patient's cells, as compared with healthy B cells. However, these expressions did not significantly change in large diffuse B cell lymphoma lymph nodes compared with benign ones. This study points out that neurotensin and its two specific receptors are expressed in human B lymphocytes. Such expressions were not described, and their relationship in B cell diseases, especially in chronic B cell leukemia, needs to be considered further in regard to these findings. *The Journal of Immunology*, 2012, 189: 5293–5303.

Neurotensin, a 13-aa neuropeptide, was first identified in the central and peripheral nervous system and gastrointestinal tract (1). Initially isolated from bovine hypothalamus, neurotensin is present in several species including human. It is synthesized from a common precursor in mammalian brain and intestine (2). In the brain, neurotensin is exclusively located in nerve terminal fibers and cells (3). Peripheral neurotensin in the endocrine N cells is mostly located in the intestinal mucosa (4).

Three neurotensin receptors (NTSRs) have been identified and cloned from rat, mouse, and human cells (5). They include two G protein-coupled receptors: the high-affinity receptor NTSR1 and the low-affinity receptor NTSR2 (6). NTSR1 expression was recently demonstrated in aggressive malignant solid tumors such as mesothelioma (7), non-small-cell lung (8), breast (9), and head and neck squamous (10) carcinomas. NTSR2 shares 60% homology with NTSR1 (6). Its expression in cancer was rarely reported, except in patients with prostatic cancer (11). The third receptor, NTSR3 or sortilin, common to neurotrophins and neurotensin, is not a G protein-coupled receptor. It belongs to the Vps10p in-

tracellular protein family (12) and was originally described as able to transport immature and mature neurotrophins in the CNS, and to lead to axonal growth and neural cell proliferation (13, 14). NTSR3 is predominantly located in endoplasmic reticulum/Golgi compartment. A minority of NTSR3 is also expressed at the plasma membrane as a coreceptor for p75^{NTR}. It binds proneurotrophins, thus activating apoptotic pathways (15, 16), as previously described in human B lymphocytes, as well as in B cell lines independently of their maturation stages (17).

Neurotensin exhibits a wide variety of biologic actions in both peripheral tissues and CNS. Its major action in the brain is the regulation of dopaminergic system (18). In the periphery, it exerts endocrine and paracrine actions, especially in the homeostasis of intestinal functions (19). Neurotensin is also implicated in tumor progression, including proliferation of various types of human cancer lines (colon, prostate, lung, pancreas, breast), especially through its ligation to NTSR1 (20–24).

A few studies reported the involvement of neurotensin in inflammation through mast cell activation (25–28), cytokine (IL-8 and IL-6) production (29–31), neutrophil chemotaxis (32), and NO generation (33).

Neurotensin expression was not previously described in B lymphocytes. However, we have previously characterized NTSR3 (sortilin) in human B lymphocytes. Neurotrophins, especially brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and another neuropeptide, neurotensin, share this receptor (17). In B cell lines, sortilin exhibits a dual function: 1) the transport of BDNF that leads to an autocrine B cell survival loop by the activation of its tropomyosin-related kinase B receptor; and 2) the function of coreceptor for p75^{NTR}, in the binding of the immature proapoptotic form of BDNF (17). In B cell lines, this proapoptotic function was inhibited by another sortilin ligand, neurotensin, as previously described in neural cells (16). A similar dual function of sortilin was recently reported in NK cells (34).

^{*}Department of Immunology, University of Limoges, Equipe Accueil 3842, 87025 Limoges, France; [†]Department of Internal Medicine, University of Limoges, Equipe Accueil 3842, 87025 Limoges, France; [‡]Unité Mixte de Recherche 7276, Centre National de la Recherche Scientifique, 87025 Limoges, France; and [§]Department of Hematology, University of Limoges, 87042 Limoges, France

¹S.S. and P.M. contributed equally to this work.

Received for publication October 11, 2011. Accepted for publication October 3, 2012.

This work was supported by Ligue Contre le Cancer and Région Limousin.

Address correspondence and reprint requests to Prof. Marie-Odile Jauberteau, Department of Immunology, EA 3842, Limoges University, 2 Avenue Docteur Marcland, 87025 Limoges, France. E-mail address: m-o.jauberteau-marchan@unilim.fr

Abbreviations used in this article: BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CLL, chronic B cell lymphocytic leukemia; EdU, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; NTSR, neurotensin receptor; qRT-PCR, quantitative RT-PCR.

Copyright © 2012 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/12/\$16.00

Some data are available on neurotensin and NTSR expression by dendritic cells. Mouse cutaneous dendritic cell line expressed NTSR1, NTSR3, and neurotensin, which downregulated IL-6, TNF- α , and IL-10 secretions (35). As for T lymphocytes, the binding of neurotensin on the membrane of Sézary cells, several T cell lines and healthy peripheral T lymphocytes, was previously described (36). It leads to the modulation of IL-2-induced proliferation through the binding to membranous NTSR1, which is expressed by T cell lines (37). The presence of another unidentified NTSR was also suggested on both T cell line and peripheral lymphocytes (36). In addition, NTSR receptor was described by ligand-binding analysis on the EBV⁺ Burkitt cell line RAJI, but RT-PCR analysis did not identify this receptor as NTSR1 (38).

Neurotensin exhibits proliferative or antiproliferative functions on immune cells depending on the cytokine environment. Indeed, neurotensin enhanced proliferation of Molt-4 and Jurkat T cell lines stimulated with PHA (36); by contrast, neurotensin inhibited IL-2-induced proliferation of Sézary cells (37).

Data concerning NTSR expression on both B and plasma cells were previously focused on NTSR3 expression. Indeed, an autocrine regulation linked to sortilin was characterized in human B cell lines, and a production of this endogenous protein was also shown in normal B cells (17). Implication of neurotensin in cell proliferation was clearly established in solid cancer cells, but, to our knowledge, its potential role in B cells was not investigated.

We hypothesized that neurotensin and its two specific receptors, NTSR1 and NTSR2, could also be expressed in B lymphocytes. We therefore studied human B cell lines at different stages of maturation. The functional properties of NTSR1 in B cell lines were studied. Therefore, the expression of neurotensin and its two specific receptors was evaluated by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) in malignant human B cell diseases and compared with healthy peripheral resting and activated B cells or other nonhematopoietic malignant or benign lymph nodes.

Materials and Methods

Human B cell lines

The studied B cell lines at different maturation stages were pro-B cells (RS4; 11 from acute leukemia), pre-B cells (Nalm6 from acute lymphoblastic leukemia), mature B cells (BL2 and BL41, EBV⁺ Burkitt lymphoma cell lines), and plasma cells (the myeloma cell lines RPMI 8226 and U266). They were kindly provided by K. Lassoued (Amiens, France) and J. Feuillard (Limoges, France). Cell cultures were repeatedly controlled free of mycoplasma contamination by the Hoechst staining method, and EBV negativity was confirmed by PCR (performed by S. Ranger-Rogez, Limoges, France).

Human B lymphocytes from healthy donors and chronic B cell leukemia patients

Blood samples from 17 healthy volunteers and 6 patients with chronic B cell leukemia (CLL) were included in this study, after approval of the Institutional Ethic Committee (N° 72-2011-18) in accordance with the Declaration of Helsinki.

The cells were isolated from 40-ml samples of venous blood obtained using heparinized Vacutainer cells preparation tube (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) by Ficoll-Paque density centrifugation (Eurobio, Courtaboeuf, France). In brief, PBMCs were isolated after centrifugation at $280 \times g$ for 30 min. B lymphocytes were then isolated by positive selection with either CD19 magnetic beads or B Cell Isolation Kit II Negative selection kit (all MACS; Miltenyi Biotec, Paris, France) according to manufacturer's protocols. This procedure resulted in >90% CD19⁺ cells, as determined by flow cytometric analyses using PE cyanine 7-conjugated anti-CD19 Ab (Beckman Coulter, Villepinte, France).

Lymph nodes from patients with diffuse large B cell lymphoma, colonic carcinoma metastases, or nonmalignant disease

Frozen lymph nodes were obtained from seven patients with diffuse large B cell lymphomas and six patients with metastatic colonic adenocarcinoma.

Benign lymph nodes from three sarcoidosis patients were used as controls. They were obtained from the Tumor Bank of Limoges University Hospital, under protocols approved by the Institutional Review Board (AC N 2007-34, DC 2008-604, and 72-2011-18).

Cell culture

Cells lines were cultured in a humidified 5% CO₂–95% air incubator in 75-cm² flasks (Nunc, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) at 37°C in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Paisley, U.K.), supplemented with 10% FCS and 1% each MEM vitamins, nonessential amino acids, sodium pyruvate, and penicillin-streptomycin (Life Technologies). All cells lines were maintained between 1×10^6 and 2×10^6 cells/ml, and medium was replaced every 3 d.

Peripheral normal B cells were cultured in 96 round-bottom plates (Nunc) at 2×10^6 cells/ml in 20% FCS-containing RPMI1640 medium supplemented as described earlier. Normal B cells (2×10^6 cells/ml) were stimulated with affinityPure goat anti-human IgA+IgG+IgM (H+L) F(ab)² fragments (10 μ g/ml; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), and recombinant human soluble CD40L (10 ng/ml), B cell-activating factor (10 ng/ml), and IL-4 (0.2 ng/ml; all from PeproTech, Rocky Hill, NJ) for 24 h.

Cultured cells were stressed by 24–168 h serum deprivation, a 24-h exposure to anti-Fas agonistic mAb (100 ng/ml; clone 7C11, sodium azide free; Beckman Coulter), or exposed for 24 h to 40 μ M exogenous neurotensin (Calbiochem, La Jolla, CA). The optimal neurotensin concentration was determined by colorimetric 2,3-bis-(2-methoxy-5-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) viability assay (Roche Diagnostic), according to the manufacturer's instructions. In apoptotic experiments, anti-NTSR1 antagonistic Ab (clone B-N6, sodium azide-free, 50 nM; Diacclone) was added to the cultures during 24 h (39).

Pharmacological assays were performed with SR48692, a synthetic inhibitor, also known as meclinetant (Axon Medchem, Groningen, The Netherlands), with a high specificity for NTSR1 (40) at the optimal concentration of 8 μ M. A pseudopeptide analog of neurotensin JMV449 (8-13; Tocris Biosciences, Bristol, U.K.) was also evaluated in same experiments at the optimal concentration of 40 μ M for plasmacytic cell lines and 60 μ M for B mature cell lines (41).

RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was extracted with Qiagen RNeasy isolation system (Qiagen, Hilden, Germany), treated with RNase-free DNase I (Qiagen), and quantified by NanoDrop (ND-1000) spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) at the absorbance ratio of 260 and 280 nm. The RNA quality was evaluated on Agilent 2100 bioanalyzer using the RNA 6000 Labchip kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). cDNA synthesis was performed with high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), as recommended by the manufacturer.

RT-PCR, real-time PCR analyses, and sequencing

cDNA of neurotensin, NTSR1, NTSR2, and sortilin, was used for conventional RT-PCR. cDNA were amplified for PCR with Platinum TaqDNA polymerase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) using the primers shown in Table I in UnoCycler (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Total RNA isolated from human colonic adenocarcinoma cell line (HT29) was used as positive control for neurotensin (42), NTSR1 (43), and NTSR2 expressions (44), and verified by sequencing. Thirty-five PCR cycles were performed (94°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 45 s, and an extension step of 72°C for 7 min).

Real-time PCR was performed with cDNA by means of TaqMan probes, labeled with 5' reporter dye 6FAM and the 3' Minor Groove Binder-Non-Fluorescent Quencher (MGB-NFQ) (Applied Biosystems). The quantitative PCR efficiency was assessed using regression curve performed with cDNA serial dilutions samples (400, 200, 100, 50, and 25 ng cDNA) (45).

Experiments were performed in duplicate in at least three independent experiments using 400 nM of the forward and reverse primers, 200 nM labeled probe, and 100 ng cDNA template (RNA-cDNA equivalent) per reaction mixed with TaqMan Fast-Univ Master Mix (Applied Biosystems).

PCR runs were analyzed on an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) with a two-step PCR protocol (95°C for 20 s followed by 40 cycles of 95°C for 3 s and 60°C for 30 s). The data were normalized to HPRT gene as an internal control (Human HPRT Primer/Probe Mix; Applied Biosystems). The comparative Δ Ct method was used for relative quantification of gene expression on duplicate of each reaction.

After extraction and purification of PCR products with QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions, sequencing PCR was performed with BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), and sequences were analyzed on an automated laser fluorescent DNA sequencer (ABI Prism 3130xl Genetic

Analyzer; Applied Biosystems). Homologies were checked after blasting with human neurotensin: NTSR-1, NTSR-2 GenBank sequences (NM_006183; NM_002531.2 and NM_012344.3).

Western blot analysis

Proteins were obtained from cell lysates of B cell lines cultured in both normal (containing 10% FCS) and serum-free medium, and from resting circulating normal human B cells. After two washes in PBS, cell lysates were prepared using lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 1% Nonidet P-40, 0.25%

sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, protease inhibitors mixture set III [2 µg/ml; Calbiochem], 1 mM NaF, and 1 mM Na₃VO₄) and a 10-min centrifugation at 14,000 × g.

Equal amounts of proteins from cell lysates (50 µg/lane) were separated on 10–12% SDS-polyacrylamide gels (Invitrogen, Carlsbad, CA) under denaturing conditions and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Molsheim, France). Nonspecific binding sites were blocked for 2 h with 5% nonfat dry milk in TBS. After overnight incubation at 4°C with specific Ab (dilution 1/200), membranes were incubated

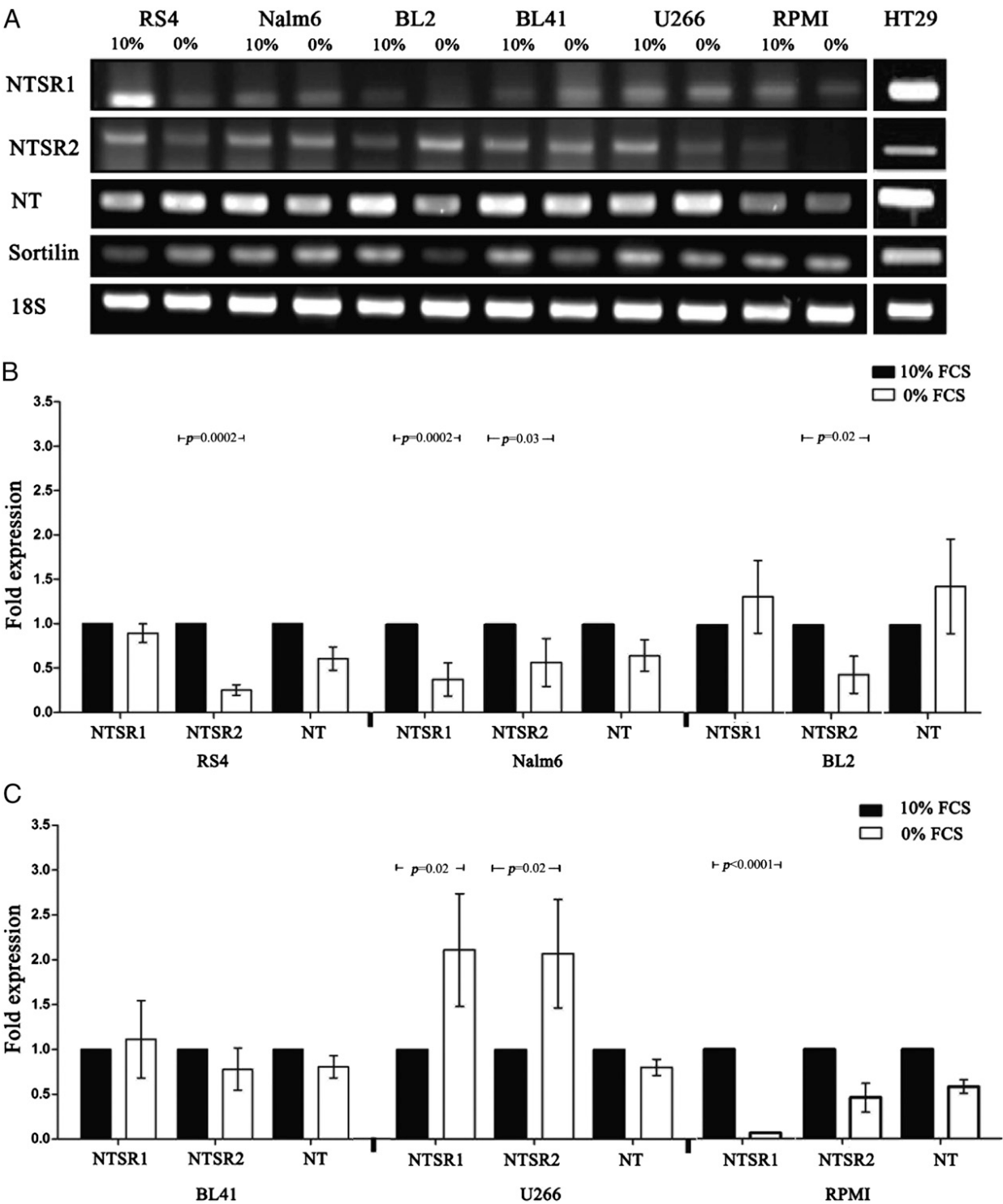


FIGURE 1. (A) Transcription of neurotensin (NT), its two G protein receptors (NTSR1, NTSR2), and sortilin by B cells lines cultured with 10% FCS (basal conditions) and 0% FCS (stress condition). The colic adenocarcinoma cell line HT29 was used as a positive control. Constitutively expressed 18S is a control of PCR efficiency. (B and C) qRT-PCR analysis of neurotensin (NT), NTSR1, and NTSR2 expression in RS4, Nalm6, BL2 (B) BL41, U266, and RPMI (C) B cell lines cultured in 72-h serum starvation (0% FCS, white histograms) compared with basal condition (10% FCS, black histograms), normalized with HPRT gene expression. The *p* values were determined in comparison with standard condition (10% FCS). Only significant results are indicated.

Table I. Forward primers, reverse primers, and probe used in qRT-PCR studies for the expression of human neurotensin and NTSR

Names		Sequences	Length (bp)	GenBank Reference
NTSR1	F	CGCCTCATGTTCTGCTACAT	113	NM_002531.2
	R	TACGTGAGCTCCACCATCAA	—	—
	Probe	AGCAGTGGACTCCGTTCTCTATGACTTCT	—	—
NTSR2	F	ATCCAGGTGAATGTGCTGGT	114	NM_012344.3
	R	CCAAGTGCCGTCCACTTCTA	—	—
	Probe	ACTAACTGCTTTCTGTAATGGGGTCACAGT	—	—
NTs	F	TGACCAATATGCATACATCAAAGA	105	NM_006183.4
	R	TAATTTGAACAGCCCAGCTG	—	—
	Probe	CATGTTCCCTCTTGGGAAGATGACTCTGCTA	—	—
18S	F	GCTGGAATTACCGCGGCTGCT	186	NR_003286.2
	R	CGGCTACCACATCCAAGGAAGG	—	—

F, Forward; NT, neurotensin; R, reverse.

with HRP-conjugated secondary Ab to mouse, rabbit, or goat Ig (Santa Cruz; dilution 1/1000) for 60 min at room temperature and revealed by chemiluminescence (ECL reagent; Amersham Life Science). Protein-loading control was performed with anti-GAPDH or anti-actin Ab (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Western blots were scanned using a bioimaging system (Genesnap; Syngene).

Flow cytometry analysis

Expression of the three NTSRs by B cell lines was studied by flow cytometry with or without permeabilization. After a 30-min incubation at room temperature with rabbit anti-NTSR1, anti-NTSR2, and goat anti-NTSR3 Ab (all 1/200; Santa Cruz Biotechnology) in PBS containing 1% BSA followed by two washes in PBS, Abs were revealed using Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG Ab (10 mg/ml; Invitrogen) for 30 min at 4°C. Cells stained with rabbit isotypic Ig (Santa Cruz Biotechnology) were used as controls to determine background and positivity thresholds. After washing twice in PBS, cells were suspended in PBS and analyzed with a flow cytometer (FACSCanto II).

Immunocytochemical staining

After two washes in PBS, the cells were fixed with frozen 90% acetone, washed twice in PBS, and incubated for 1 h in PBS containing 5% goat serum. Cells

were then incubated overnight at 4°C with primary Ab diluted in PBS-BSA. The following Abs were used: rabbit polyclonal anti-NTSR1, anti-NTSR2 (1/200; Alomone Labs, Jerusalem, Israel), goat anti-NTSR3/Sortilin (1/100; R&D Systems, Lille, France), and rabbit anti-neurotensin (1/200; Santa Cruz Biotechnology). Cells were washed twice in PBS and incubated with 1 µg/ml Alexa Fluor 488- or 596-conjugated anti-rabbit or anti-goat IgG Ab (Invitrogen) for 30 min at room temperature. After two washes in PBS, cells were mounted in glycerol-gelatin medium (Sigma-Aldrich) and studied using a fluorescence microscope (Leica). Negative controls were cells incubated with irrelevant normal rabbit or goat IgG (Santa Cruz Biotechnology).

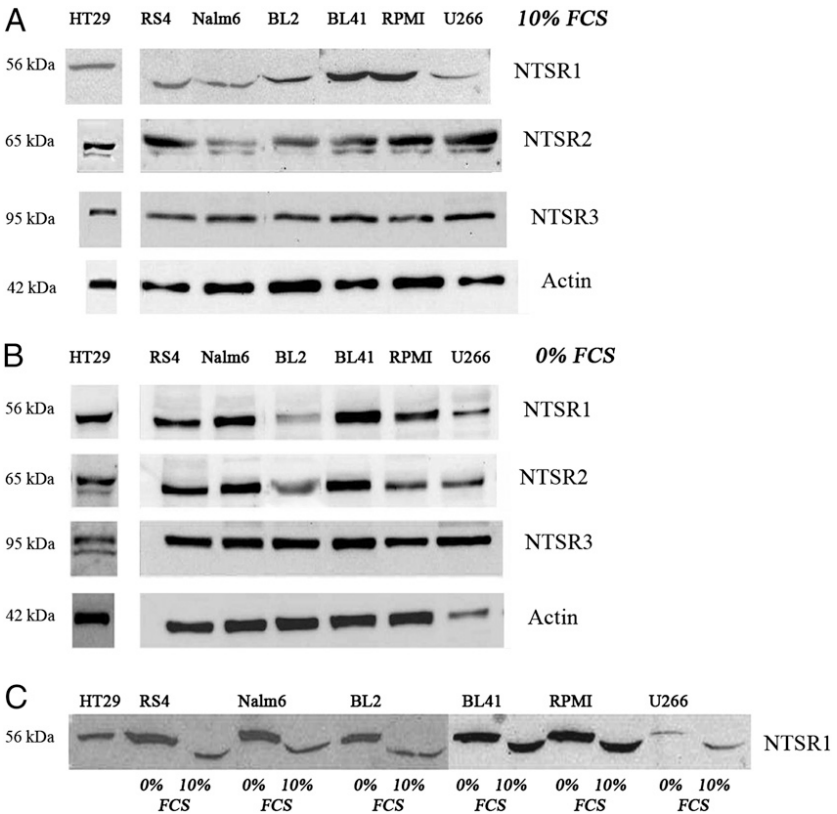
Proliferation assay

Proliferation was determined by the method of click-it EDU flow cytometry assay kits (Invitrogen), which used a modified nucleoside, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU), that is incorporated during DNA synthesis. Detection is based on a copper-catalyzed covalent reaction revealed with Alexa Fluor 488 dye; then flow cytometry analysis was performed to identify percentage of cells in S-phase (FACSCanto II). Each experiment was repeated at least three times.

Apoptosis assay

Apoptosis was evaluated by measurement of cytoplasmic soluble nucleosome determined following the manufacturer's instructions of ELISA Cell

FIGURE 2. Western blot analysis of whole-cell lysates for NTSR1, NTSR2, and NTSR3 in all studied cell lines in basal (10% FCS) (A) and in serum deprivation (0% FCS) (B) conditions. Isoforms of NTSR1 receptor depend on culture conditions in all studied cell lines (C).



Death kit (Roche) (17). In brief, cells were seeded in 96-multiwell plate (5×10^4 cells/well) and cultured for 24 to 168 h in serum deprivation alone or with recombinant neurotensin (40 μ M). Absorbance values were measured at 405 nm with an ELISA reader (Labsystems). The absorbance obtained in controls was normalized to a value of 1, as previously described (46). Every experiment was performed three times independently.

Data analysis

Data are presented as mean values \pm SEM of at least three independent experiments. To determine statistical significance of difference versus control, one-way ANOVA was used. The p values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Neurotensin and NTSR transcripts and proteins are expressed in human B cell lines

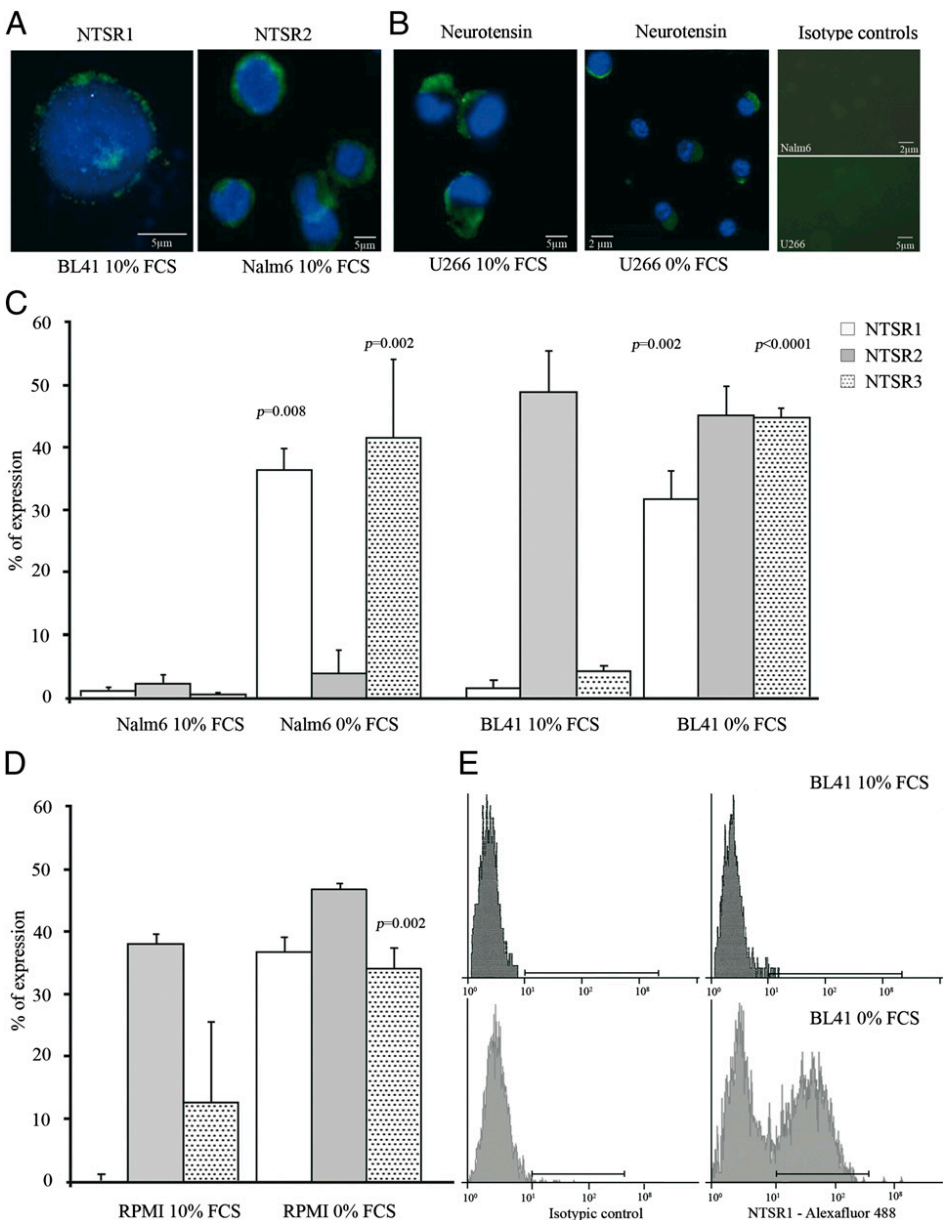
Expression of neurotensin and NTSR in human B cells lines was performed by RT-PCR in comparison with HT29 line (Fig. 1A) (Table I). Under basal (10% FCS-containing culture) or starvation conditions, NTSR1, NTSR2, and NTSR3 transcripts were detected in all B cell lines whatever their maturation stages (Fig. 1A). By qRT-PCR, a significant decrease of NTSR1 transcription was detected

after a 72-h serum deprivation in Nalm6 and RPMI cell lines ($p = 0.0002$ and $p < 0.0001$, respectively; Fig. 1B, 1C), whereas it was enhanced in U266 cells ($p = 0.02$; Fig. 1C). NTSR2 transcription levels were also diminished by a 3-d serum starvation in RS4, Nalm6, and BL2 cell lines ($p = 0.0002$, $p = 0.03$, and $p = 0.02$, respectively; Fig. 1B) but increased in U266 ($p = 0.02$; Fig. 1C). By contrast, neurotensin transcription, detected in 10% FCS-culture condition in all cell lines, was unchanged by serum deprivation (Fig. 1B, 1C).

Sequencing of B cell line transcripts eluted from agarose gels showed the expected sequences of human neurotensin, NTSR1 and NTSR2, thus confirming their expression in human B cell lines.

Western blotting analysis identified two NTSR1 protein isoforms depending on culture conditions. Under basal condition, a 56-kDa form was present in the control HT-29 cell line, whereas a lower 54-kDa form was observed in all B cell lines (Fig. 2A, 2C). However, in deprivation condition, only the 56-kDa NTSR1 protein was identified in the B cell lines and control (Fig. 2B, 2C). A NTSR2 protein was also identified in all B cell lines whatever the culture conditions (Fig. 2A, 2B). We confirmed the presence of NTSR3 protein in all B cell lines independently of culture conditions, as previously described (17) (Fig. 2A, 2B).

FIGURE 3. (A) Intracytoplasmic expression of NTSR1 and NTSR2 in mature (BL41) and pre-B (Nalm6) cell lines. Similar staining of NTSR1 and NTSR2 were obtained with the four other cell lines (data not shown). (B) Neurotensin expression in plasma cells (U266) cultured with (10%; left panel) and without (0%) FCS. Rabbit IgG isotype controls staining with goat anti-rabbit Alexa Fluor 488-conjugated Ab (right panels). (C and D) FACS analysis of membranous NTSR1 (white histograms), NTSR2 (gray histograms), and NTSR3 (spotted histograms) expression on unpermeabilized pre-B (Nalm6) (C), mature B cells (BL41) (C) and plasmacytes (RPMI) (D) in standard conditions (10% FCS) and after 24 h of serum deprivation (0% FCS) conditions. Histograms are means \pm SEM of three independent experiments. The p values were determined in comparison with standard condition (10% FCS). Only significant results are indicated. (E) Flow cytograms of membranous NTSR1 expression in BL41 cell line cultured under standard conditions (10% FCS) or after a 24-h serum starvation (0% FCS). Cells are stained with isotypic controls (left graphs) and anti-NTSR1 Ab (Alexa Fluor 488; right graphs). Cytograms are representative of three independent experiments. Similar stainings are obtained for other cell lines and NTSR2 and NTSR3 expression.



Immunofluorescence studies showed NTSR1 and NTSR2 expression in all B cell lines under both culture conditions (Fig. 3A). In contrast, neurotensin was detected only in mature B and plasma cells (Fig. 3B) with a polarized staining enhanced after a 3-d serum deprivation (Fig. 3B).

Membranous expression of NTSR1 and NTSR3 is induced by serum deprivation in human B cell lines

The membranous expression of the three NTSRs was analyzed by flow cytometry. NTSR3 membranous expression was restricted to proapoptotic conditions (serum starvation) as previously described (17). Similarly, deprivation culture induced a clear-cut membranous expression of NTSR1 on pre-B, mature B, and in plasmacytic cell lines (all $p < 0.05$; Fig. 3C–E). In contrast,

NTSR2 expression was expressed on the membrane of 40–50% of the mature and plasmacytic cells cultured with 10% FCS, with no significant modification by proapoptotic conditions (Fig. 3C, 3D).

Exogenous neurotensin promotes proliferation and prevents apoptosis of human B cell lines

Because neurotensin and specific receptors were detected in human malignant B cell lines, we searched for their potential functions under the different culture conditions. Although NTSRs were expressed under basal culture condition, a 24- to 48-h incubation of the lines with exogenous neurotensin did not modify cell proliferation, whatever the maturation stage (pre-B, B mature, or plasmacytic lines; Fig. 4A).

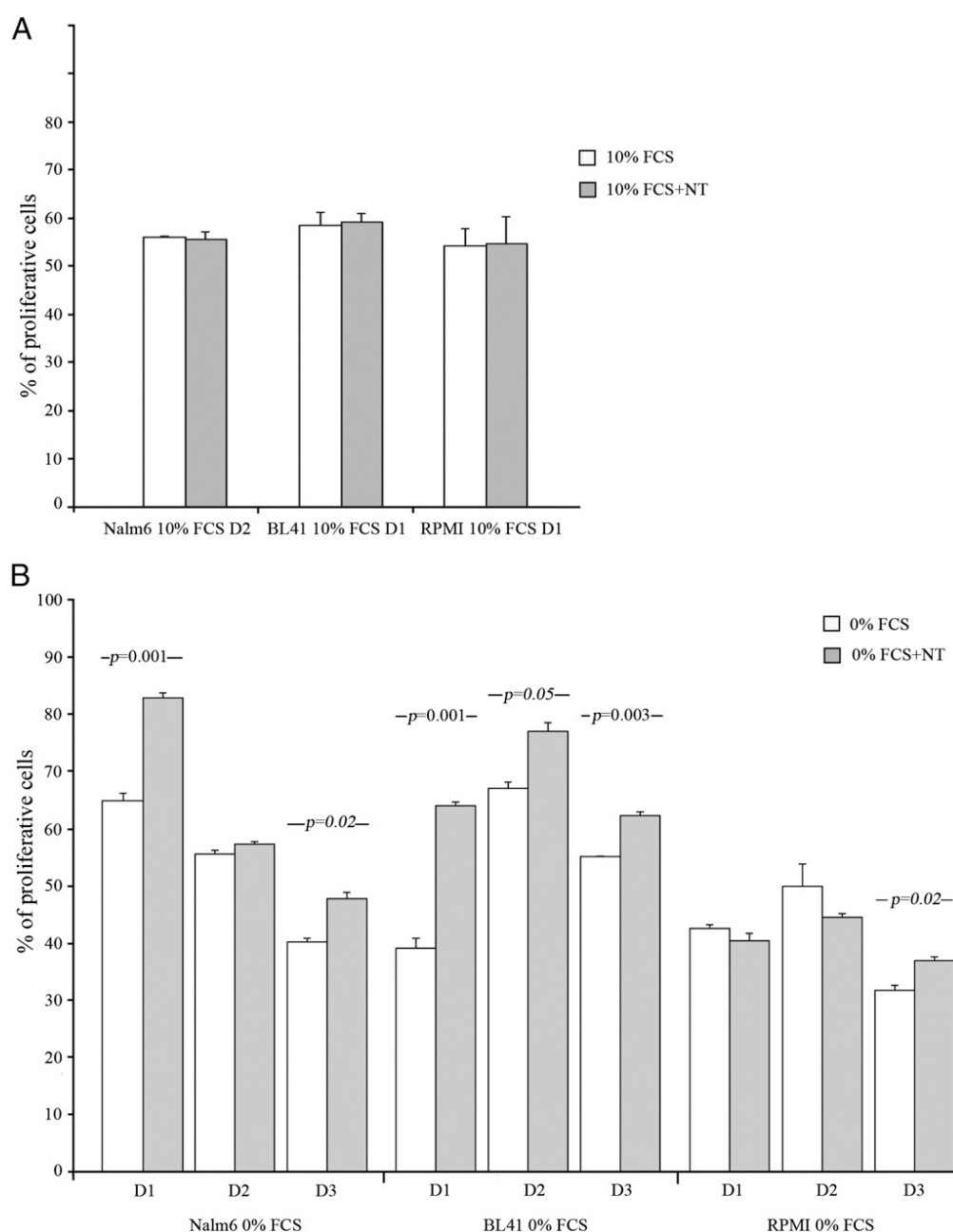


FIGURE 4. Neurotensin induced B cell proliferation under deprivation conditions. **(A)** Percentage of proliferative cells determined with EdU incorporation by flow cytometry on pre-B (Nalm6), mature B (BL41), and plasma (RPMI) cells cultured 24 (D1) to 48 (D2) h with (gray histograms) or without (white histograms) neurotensin and 10% FCS. **(B)** Percentage of proliferative cells determined with EdU incorporation by flow cytometry on pre-B (Nalm6), mature B (BL41), and plasma (RPMI) cells cultured 24 (D1) to 72 (D3) h with (gray histograms) or without (white histograms) 40 μ M neurotensin and 0% FCS. The p values were determined in comparison with serum-free condition alone (0%).

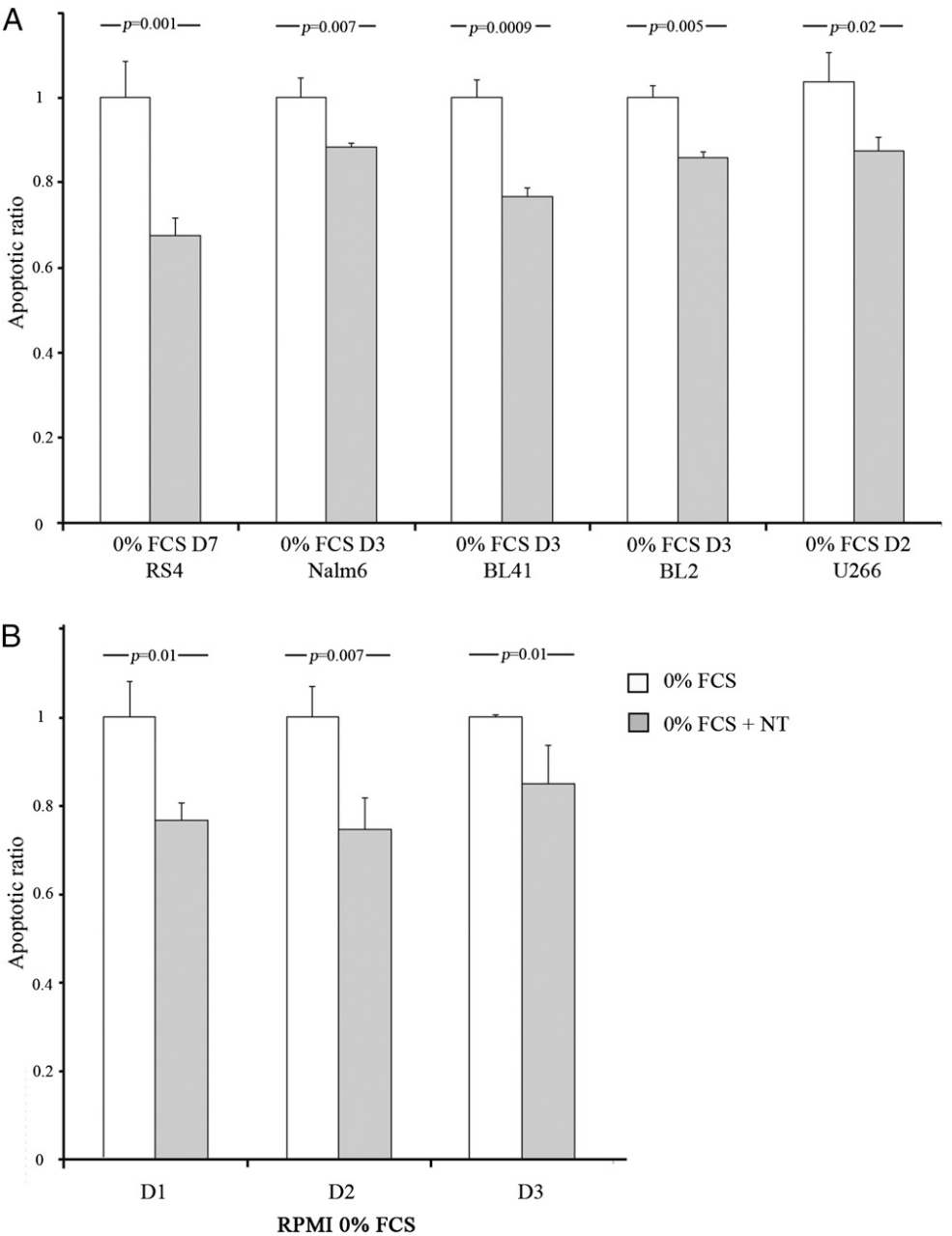
In contrast, neurotensin increased the proliferation of pre-B, B mature, and plasmacytic cells cultured under deprivation conditions (Fig. 4B). The most significant effects of neurotensin were observed after 24 h for pre-B (Nalm6) and B mature (BL41), and after 72 h for plasma cells (RPMI; Fig. 4B). Therefore, we hypothesized that neurotensin could be involved in a mechanism of escape to cell death.

We thus performed apoptosis assays in the presence of exogenous neurotensin (40 μ M) under stressed conditions (1–7 d serum deprivation). Apoptosis was inhibited by neurotensin after 6 d of serum deprivation of the pro-B cell line RS4, 3 d for the pre-B cell line Nalm6 and the two B mature cell lines (BL41 and BL2), 2 d for the U266 plasma cell line (all $p < 0.05$; Fig. 5A). The antiapoptotic effect of neurotensin was significant after 24 h of serum starvation of the RPMI cell line and maximum after 2 d (all $p < 0.05$; Fig. 5B).

Fas-induced apoptosis is downregulated by exogenous neurotensin

The effect of neurotensin on another apoptotic pathway was performed by the activation of the cell surface death receptor, Fas (CD95) in pro-B (Nalm6), mature B (BL2), and plasmacytic (RPMI) cell lines under both standard and deprivation conditions. Incubation with the agonistic anti-Fas Ab 7C11 induced a significant decrease of the apoptotic ratio in the presence of exogenous neurotensin in 10% FCS cultures of pro-B (Nalm6) and plasma (RPMI) cell lines ($p = 0.04$ and $p = 0.01$, respectively), but not in the BL2 mature B cell line (Fig. 6A). After serum starvation, the protective effect of neurotensin was clear-cut in all studied cell lines. Indeed, neurotensin inhibited Fas-induced apoptosis in pre-B (Nalm6; $p = 0.01$) and mature B (BL2; $p = 0.005$) cell lines, as well as in plasmacytic U266 ($p = 0.004$) and RPMI ($p = 0.002$) cells as previously reported (Fig. 6B) (17).

FIGURE 5. Relationship between neurotensin (NT) and serum deprivation-induced apoptosis. **(A)** Apoptosis (ratios) of RS4, Nalm6, BL41, BL2, and U266 B cell lines induced by a 24- (D1) to 168-h (D7) serum deprivation alone (white histograms) or associated with 40 μ M recombinant NT (gray histograms). The p values were determined in comparison with serum-free condition alone (0% FCS). **(B)** Apoptosis (ratios) of RPMI plasma cell-line induced by a 24- (D1) to 36-h (D3) serum deprivation alone (white histograms) or associated with 40 μ M recombinant NT (gray histograms). The p values were determined in comparison with serum-free condition alone (0% FCS).



JMV 449, a pseudopeptide analog of neurotensin, also decreased cell death ratios in both U266 and RPMI cells cultured without serum, in accordance with the protective effect of natural neurotensin ($p < 0.05$; Fig. 6C). These results led us to study the involvement of NTSR1 in the antiapoptotic function of neurotensin.

NTSR1 inhibition suppresses the antiapoptotic function of neurotensin in mature and plasma cells after serum starvation

We evaluated the effect of an NTSR1 inhibitor (SR48692 or meclintant) on neurotensin-induced cell survival. The inhibitor suppressed the protective effect of neurotensin on RPMI and U266

($p < 0.001$) cells maintained in 24- to 72-h serum-free cultures (Fig. 6C). Similar results were obtained with antagonistic anti-NTSR1 Abs (B-N6) in RPMI cell line after a 24-h serum starvation (Fig. 6C).

In view of the effects of neurotensin and NTSR1 in malignant B cell lines, especially in mature and plasmacytic cells, we looked for their expression in normal human peripheral B lymphocytes.

NTSR and neurotensin expression in healthy peripheral human B lymphocytes

Peripheral B cells isolated from 6 healthy donors were studied by qRT-PCR under basal conditions (10% FCS; $n = 6$) or after a 24-h

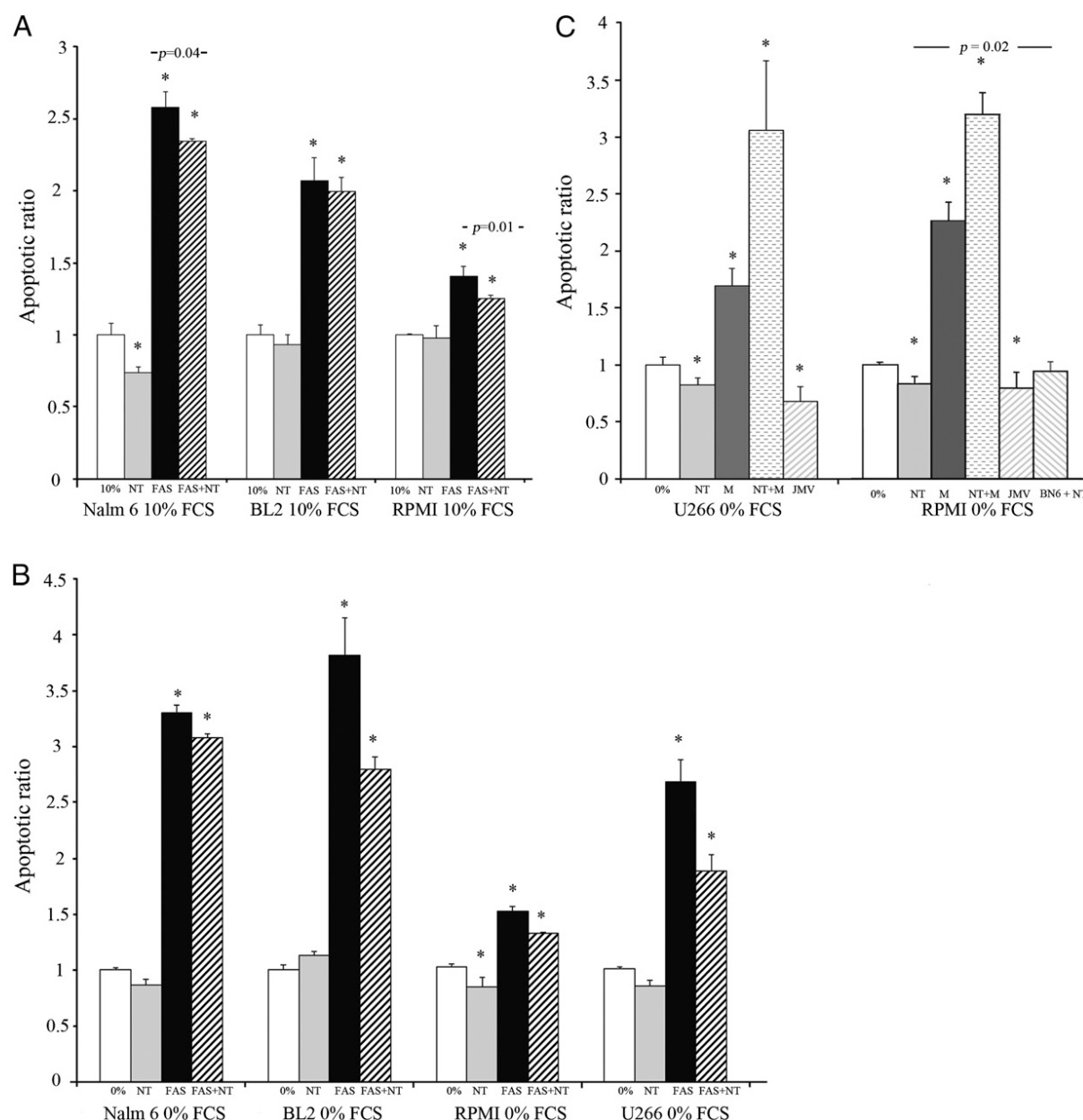


FIGURE 6. Relationship between neurotensin (NT) and Fas-induced apoptosis. Effect of NTSR1 antagonist and neurotensin analog on 0% FCS-induced apoptosis. **(A)** Apoptosis (ratios) of Nalm6, BL2, and RPMI B cell lines induced after 24 h of Fas activation by an agonistic mAb (Fas; black histograms) associated or not with 40 μ M recombinant NT (Fas+NT; black hatched histograms). *Significant p values determined in comparison with standard condition (10%) are indicated. **(B)** Apoptosis (ratios) of Nalm6, BL2, U266, and RPMI B cell lines induced after a combination of serum deprivation (0%) and a 24-h Fas activation by an agonistic mAb (Fas; black histograms) associated or not with 40 μ M recombinant NT (Fas+NT; black hatched histograms). *Significant p values determined in comparison with serum deprivation condition (0%) are indicated. **(C)** Apoptosis (ratios) of U266 and RPMI B cell lines induced in serum deprivation (0%) by NT (light gray histograms), NT analog JMV449 (JMV; gray hatched histograms), pharmacological inhibitor of NTSR1 meclintant (M; dark gray histograms) combined or not with NT (M+NT; gray spotted histograms) and anti-NTSR1 antagonistic Ab with NT (BN6+NT; gray hatched histograms). *Significant p values determined in comparison with serum deprivation condition (0%) are indicated.

stimulation with sCD40L, anti-Ig, BAFF, and IL-4 ($n = 5$). Analysis revealed the presence of NTSR1, NTSR2, and neurotensin transcripts in resting B lymphocytes. However, their activation induced a significant downregulation of NTSR1 ($p = 0.04$) and NTSR2 ($p = 0.03$; Fig. 7A). Western blot analysis confirmed the expression of both NTSR1 and NTSR2 by circulating B cells at the protein level (Fig. 7B).

Quantification of NTSR1, NTSR2, and neurotensin gene expression in CLL B cells and in lymph nodes from diffuse large B cell lymphoma

NTSR2 expression was significantly higher in purified B cells from the six CLL patients than in human normal resting ($n = 6$; $p = 0.0002$, Fig. 7A) or activated B cells ($n = 5$; $p < 0.0001$; Fig. 7A). In contrast, neurotensin expression by CLL cells was undetectable.

Levels of NTSR1 and NTSR2 gene expression were variable in lymph nodes from seven diffuse large B cell lymphoma patients and (as controls) from six metastatic colic adenocarcinoma patients, and benign lymph nodes from three patients with sarcoidosis. A significant difference of NTSR2 expression was observed between metastatic and normal lymph nodes ($p = 0.03$; Fig. 8). Neurotensin expression was lower in B cell lymphoma lymph nodes than in nonmalignant nodes ($p = 0.0005$; Fig. 8).

Discussion

The neurotrophin BDNF was recently identified as endogenous growth and survival factor in B lymphocytes (17, 47). Whereas BDNF acts through its high-affinity receptor, we identified sortilin in human B lymphocytes. This protein displays dual functions—transport of neurotrophins and coreceptor for immature form of neurotrophins—thus activating death signaling through sortilin/ $p75^{\text{NTR}}$ receptor complex (17). Sortilin is also known as a receptor for another neuropeptide, neurotensin (12). Because sortilin is detected in human B cells whatever the maturation stage (17), we hypothesized that neurotensin and other NTSRs could also be expressed by B cells.

We detected in this study for the first time, to our knowledge, the expression of neurotensin and its high (NTSR1) and low (NTSR2)-affinity receptors in human B cell lines, primary malignant B cells from CLL patients and healthy peripheral B cells with variable mRNA expression levels by the lines, depending on culture conditions. Although NTSR2 mRNA levels decreased in RS4 and Nalm6 cells maintained in a 72-h serum-free culture, NTSR1 or both NTSR1 and NTSR2 levels increased in BL2 and U266 cells. However, NTSR1 and NTSR2 protein levels appeared to be unchanged. Such a discrepancy between mRNA and protein levels in cell lines was previously reported for NTSR expression (11). In addition, we also observed m.w. variations of NTSR1, depending on culture conditions. It was particularly high under serum starvation conditions. These findings are in accordance with a recent study that demonstrated the occurrence of a posttranscriptional maturation of the receptor, depending on glycosylation, after serum starvation. This mature NTSR1 is able to recruit small G proteins in membranous microdomains, especially under serum starvation (48). These data suggested that stress-culture conditions of B cell lines induced the maturation of NTSR1 as detected by higher molecular form of this receptor (48).

In addition, serum starvation enhanced the membranous location of NTSR1 in all human B cell lines. We have previously observed such heterogeneity of tropomyosin-related kinase B receptor cell expression under serum starvation in these cell lines (17). Similar findings concerning plasmacytic cell lines, especially U266, were previously reported (49). Moreover, neurotensin enhanced B cell line proliferation in stressed cultures.

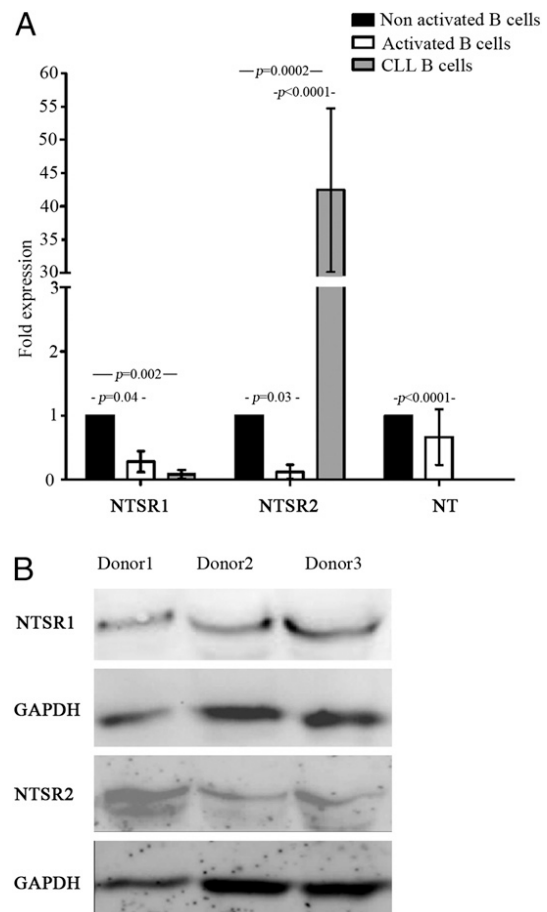


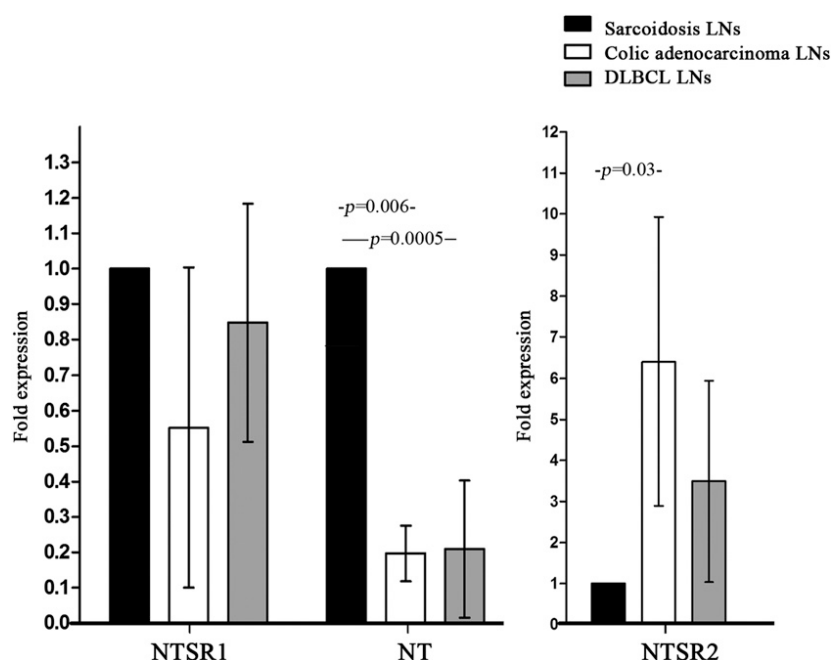
FIGURE 7. (A) qRT-PCR analysis of neurotensin, its two specific receptors (NTSR1, NTSR2) in resting ($n = 6$, black histograms) or activated ($n = 5$, white histograms) normal B cells and chronic B cell leukemia ($n = 6$, gray histograms). Gene expressions are normalized with the housekeeping gene HPRT expression. Data are expressed as means of fold expression (relative quantification) values \pm SEM of each gene in comparison with nonactivated normal B cell normalized to an arbitrary value of 1. Significant p values are indicated in the graphic and calculated from ΔCt values with ANOVA tests. **(B)** Western blot analysis of whole-cell lysates for NTSR1 and NTSR2 by resting circulating B cells of three healthy volunteers representative of six experiments.

The involvement of neurotensin and specific receptors was previously examined in nonhematological cancer models (50). They stimulate cancer cell growth (21), mainly through binding to NTSR1, that is overexpressed in many cancer cell lines (51). NTSR1 expression is also associated with a poor prognosis in human lung cancer (8, 9). In contrast, neurotensin is able to prevent serum starvation or IL-induced apoptosis in pancreatic cells after binding to NTSR2 or NTSR3 (52).

Recently, another role of neurotensin was established. Coppola and colleagues (53) demonstrated its implication in antiapoptotic pathways. Similarly, we studied the effects of neurotensin on B cell line apoptosis, and we showed a protective effect in human B cell lines cultured under two stress conditions: serum starvation combined or not with Fas activation.

We thus could hypothesize that neurotensin enhanced B cell line survival through the NTSR1 activation pathway. Indeed, inhibition of NTSR1 using the pharmacological inhibitor SR-48692, also named meclinetant, or antagonistic anti-NTSR1 mAb suppressed protective effect of neurotensin on stress-induced apoptosis. In plasma B cell lines, the mechanism involved the high-affinity receptor. Interestingly, SR-48692 inhibitor is a potential anticancer

FIGURE 8. qRT-PCR analysis of neurotensin (NT), its two specific receptors (NTSR1, NTSR2) in lymph nodes (LNs) from sarcoidosis ($n = 3$, black histograms), colic adenocarcinoma ($n = 6$, white histograms), and diffuse large B cell lymphoma (DLBCL; $n = 7$, gray histograms). Gene expressions are normalized with the housekeeping gene HPRT expression. Data are expressed as means of fold expression (relative quantification) values \pm SEM of each gene in comparison with benign lymph nodes normalized to an arbitrary value of 1. Significant p values are indicated in the graphic and calculated from ΔCt values with ANOVA tests.



cer drug that is under evaluation in clinical trials in patients with small-cell lung cancers.

Malignant B cells and malignant and benign lymph nodes were also studied by qRT-PCR. NTSR2 transcripts (also detected in all B cell lines) were overexpressed exclusively in CLL, whereas NTSR1 expression was lower than in resting or activated human normal B lymphocytes. In diffuse large B cell lymphoma lymph nodes, this expression did not differ in comparison with benign (sarcoidosis) or colonic metastatic lymph nodes. Whereas its function is not determined in this context, this overexpression in CLL B cells supports the hypothesis that NTSR2 could be involved in apoptosis defect characteristic of the disease. Indeed, NTSR2 was previously implicated in the antiapoptotic effect of neurotensin on pancreatic β -TC3 cells (54). To evaluate the effect of NTSR2 inhibition on B cell lines, levocabastine, a pharmacological histamine-H1 receptor antagonist, also known to inhibit the neurotensin binding on NTSR2, was evaluated (55). We observed that levocabastine at 2–8 mM either induced or diminished apoptosis in combination or not with neurotensin depending on concentrations and cell lines (data not shown). This could be because of another effect of levocabastine in B cell lines. Indeed, levocabastine was previously described as a ligand to VLA-4 integrin (56), and its inhibition is involved in B cell apoptosis (57).

To our knowledge, the function of NTSR2 was not established in other cancer cells, although its expression in cancer was recently described in prostatic cancer. It was found in the most differentiated malignant cell lines and patient's primary cells, whereas NTSR1 was prominently expressed in undifferentiated neoplastic cells (11). The antiapoptotic effect of neurotensin on pancreatic cell line depends on its binding to NTSR2 (53). Therefore, we could hypothesize that NTSR2 overexpression in CLL could be related to the apoptosis defect of these cells (58).

Altogether, these data point out that neurotensin and its two specific receptors are expressed in B cell lines and primary healthy and malignant B cells. The proliferative and antiapoptotic effect of neurotensin in B cell lines suggests that neurotensin could exert an important role in B cell functions. The neuropeptide and its receptors are expressed in resting and activated normal B cells also, and their potential implication in diseases is reinforced by NTSR2

overexpression in CLL B cells. These results combined with previous reports on neurotensin and its receptors expression by T lymphocytes (59), macrophages, (33) and dendritic cells (35) suggest that neurotensin could modulate immune responses and cell interactions. In addition, our results providing evidence that the neurotensin-NTSR axis is able to generate prosurvival signals in B lymphocytes suggests that it could be a potential therapeutic target.

Acknowledgments

We thank Dr. B. Bessette for contribution to flow cytometry analysis and Prof. J.L. Preud'homme for critical review of this manuscript.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Carraway, R., and S. E. Leeman. 1973. The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalamus. *J. Biol. Chem.* 248: 6854–6861.
- Carraway, R., S. E. Ruane, and H. R. Kim. 1982. Distribution and immunohistochemical character of neurotensin-like material in representative vertebrates and invertebrates: apparent conservation of the COOH-terminal region during evolution. *Peptides* 3: 115–123.
- Uhl, G. R., R. R. Goodman, and S. H. Snyder. 1979. Neurotensin-containing cell bodies, fibers and nerve terminals in the brain stem of the rat: immunohistochemical mapping. *Brain Res.* 167: 77–91.
- Helmstaedt, V., G. E. Feurle, and W. G. Forssmann. 1977. Ultrastructural identification of a new cell type—the N-cell as the source of neurotensin in the gut mucosa. *Cell Tissue Res.* 184: 445–452.
- Vincent, J. P., J. Mazella, and P. Kitabgi. 1999. Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 302–309.
- Mazella, J., J. M. Botto, E. Guillemare, T. Coppola, P. Sarret, and J. P. Vincent. 1996. Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J. Neurosci.* 16: 5613–5620.
- Alifano, M., M. Loi, S. Camilleri-Broët, S. Dupouy, J. F. Régnard, and P. Forgez. 2010. Neurotensin expression and outcome of malignant pleural mesothelioma. *Biochimie* 92: 164–170.
- Alifano, M., F. Souazé, S. Dupouy, S. Camilleri-Broët, M. Younes, S. M. Ahmed-Zaid, T. Takahashi, A. Cancellieri, S. Damiani, M. Boaron, et al. 2010. Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 16: 4401–4410.
- Dupouy, S., V. Viardot-Foucalt, M. Alifano, F. Souazé, G. Plu-Bureau, M. Chaouat, A. Lavour, D. Hugol, C. Gespach, A. Gompel, and P. Forgez. 2009. The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. *PLoS ONE* 4: e4223.

10. Shimizu, S., J. Tsukada, T. Sugimoto, N. Kikkawa, K. Sasaki, H. Chazono, T. Hanazawa, Y. Okamoto, and N. Seki. 2008. Identification of a novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinomas: a role for the neurotensin-neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway. *Int. J. Cancer* 123: 1816–1823.
11. Swift, S. L., J. E. Burns, and N. J. Maitland. 2010. Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer. *Cancer Res.* 70: 347–356.
12. Mazella, J., N. Zsürger, V. Navarro, J. Chabry, M. Kaghad, D. Caput, P. Ferrara, N. Vita, D. Gully, J. P. Maffrand, and J. P. Vincent. 1998. The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 26273–26276.
13. Chen, Z. Y., A. Ieraci, H. Teng, H. Dall, C. X. Meng, D. G. Herrera, A. Nykjaer, B. L. Hempstead, and F. S. Lee. 2005. Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J. Neurosci.* 25: 6156–6166.
14. Munck Petersen, C., M. S. Nielsen, C. Jacobsen, J. Tauris, L. Jacobsen, J. Gliemann, S. K. Moestrup, and P. Madsen. 1999. Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J.* 18: 595–604.
15. Teng, H. K., K. K. Teng, R. Lee, S. Wright, S. Tevar, R. D. Almeida, P. Kermani, R. Torkin, Z. Y. Chen, F. S. Lee, et al. 2005. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J. Neurosci.* 25: 5455–5463.
16. Nykjaer, A., R. Lee, K. K. Teng, P. Jansen, P. Madsen, M. S. Nielsen, C. Jacobsen, M. Kliemann, E. Schwarz, T. E. Willnow, et al. 2004. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427: 843–848.
17. Fauchais, A. L., F. Lalloué, M. C. Lise, A. Boumediene, J. L. Preud'homme, E. Vidal, and M. O. Jauberteau. 2008. Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J. Immunol.* 181: 3027–3038.
18. Binder, E. B., B. Kinkead, M. J. Owens, and C. B. Nemeroff. 2001. Neurotensin and dopamine interactions. *Pharmacol. Rev.* 53: 453–486.
19. Béraud-Dufour, S., A. Abderrahmani, J. Noel, F. Brau, G. Waeber, J. Mazella, and T. Coppola. 2010. Neurotensin is a regulator of insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42: 1681–1688.
20. Maoret, J. J., Y. Anini, C. Rouyer-Fessard, D. Gully, and M. Laburthe. 1999. Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice. *Int. J. Cancer* 80: 448–454.
21. Carraway, R. E., and A. M. Plona. 2006. Involvement of neurotensin in cancer growth: evidence, mechanisms and development of diagnostic tools. *Peptides* 27: 2445–2460.
22. Carraway, R. E., and S. Hassan. 2007. Neurotensin receptor binding and neurotensin-induced growth signaling in prostate cancer PC3 cells are sensitive to metabolic stress. *Regul. Pept.* 141: 140–153.
23. Sehgal, I., S. Powers, B. Huntley, G. Powis, M. Pittelkow, and N. J. Maitland. 1994. Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen withdrawal in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4673–4677.
24. Souazé, F., S. Dupouy, V. Viardot-Foucault, E. Bruyneel, S. Attoub, C. Gespach, A. Gompel, and P. Forgez. 2006. Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer Res.* 66: 6243–6249.
25. Brun, P., C. Mastroto, E. Beggiao, A. Stefani, L. Barzon, G. C. Sturniolo, G. Palù, and I. Castagliuolo. 2005. Neuropeptide neurotensin stimulates intestinal wound healing following chronic intestinal inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288: G621–G629.
26. Lazarus, L. H., M. H. Perrin, and M. R. Brown. 1977. Mast cell binding of neurotensin. I. Iodination of neurotensin and characterization of the interaction of neurotensin with mast cell receptor sites. *J. Biol. Chem.* 252: 7174–7179.
27. Lazarus, L. H., M. H. Perrin, M. R. Brown, and J. E. Rivier. 1977. Mast cell binding of neurotensin. II. Molecular conformation of neurotensin involved in the stereospecific binding to mast cell receptor sites. *J. Biol. Chem.* 252: 7180–7183.
28. Piliponsky, A. M., C. C. Chen, T. Nishimura, M. Metz, E. J. Rios, P. R. Dobner, E. Wada, K. Wada, S. Zacharias, U. M. Mohanasundaram, et al. 2008. Neurotensin increases mortality and mast cells reduce neurotensin levels in a mouse model of sepsis. *Nat. Med.* 14: 392–398.
29. Zhao, D., A. C. Keates, S. Kuhn-Moore, M. P. Moyer, C. P. Kelly, and C. Pothoulakis. 2001. Signal transduction pathways mediating neurotensin-stimulated interleukin-8 expression in human colonocytes. *J. Biol. Chem.* 276: 44464–44471.
30. Zhao, D., Y. Zhan, H. Zeng, H. W. Koon, M. P. Moyer, and C. Pothoulakis. 2005. Neurotensin stimulates interleukin-8 expression through modulation of I kappa B alpha phosphorylation and p65 transcriptional activity: involvement of protein kinase C alpha. *Mol. Pharmacol.* 67: 2025–2031.
31. Koon, H. W., Y. S. Kim, H. Xu, A. Kumar, D. Zhao, I. Karagiannides, P. R. Dobner, and C. Pothoulakis. 2009. Neurotensin induces IL-6 secretion in mouse preadipocytes and adipose tissues during 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 8766–8771.
32. Goldman, R., Z. Bar-Shavit, E. Shezen, S. Terry, and S. Blumberg. 1982. Enhancement of phagocytosis by neurotensin, a newly found biological activity of the neuropeptide. *Adv. Exp. Med. Biol.* 155: 133–141.
33. Kim, H. S., S. Yumkham, J. H. Choi, S. H. Lee, T. H. Kim, S. H. Ryu, and P. G. Suh. 2006. Neurotensin enhances nitric oxide generation via the JAK2-STAT1 pathway in murine macrophage Raw264.7 cells during costimulation with LPS and IFN-gamma. *Neuropeptides* 40: 221–229.
34. Rogers, M. L., S. Bailey, D. Matusica, I. Nicholson, H. Muiyerman, P. C. Pagadala, K. E. Neet, H. Zola, P. Macardle, and R. A. Rush. 2010. ProNGF mediates death of Natural Killer cells through activation of the p75NTR-sortilin complex. *J. Neuroimmunol.* 226: 93–103.
35. da Silva, L., B. M. Neves, L. Moura, M. T. Cruz, and E. Carvalho. 2011. Neurotensin downregulates the pro-inflammatory properties of skin dendritic cells and increases epidermal growth factor expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1813: 1863–1871.
36. Evers, B. M., R. J. Bold, J. A. Ehrenfried, J. Li, C. M. Townsend, Jr., and G. R. Klimpel. 1994. Characterization of functional neurotensin receptors on human lymphocytes. *Surgery* 116: 134–139, discussion 139–140.
37. Ramez, M., M. Bagot, M. Nikolova, L. Boumsell, N. Vita, P. Chalon, D. Caput, P. Ferrara, and A. Bensussan. 2001. Functional characterization of neurotensin receptors in human cutaneous T cell lymphoma malignant lymphocytes. *J. Invest. Dermatol.* 117: 687–693.
38. Petit, T., K. K. Davidson, R. A. Lawrence, D. D. von Hoff, and E. Izicka. 2001. Neuropeptide receptor status in human tumor cell lines. *Anticancer Drugs* 12: 133–136.
39. Ovigne, J. M., C. Vermot-Desroches, J. C. Lecron, M. Portier, J. Lupker, F. Pececu, and J. Wijdenes. 1998. An antagonistic monoclonal antibody (B-N6) specific for the human neurotensin receptor-1. *Neuropeptides* 32: 247–256.
40. Gully, D., M. Canton, R. Boige-grain, F. Jeanjean, J. C. Molimard, M. Poncelet, C. Gueudet, M. Heaulme, R. Leyris, A. Brouard, et al. 1993. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 65–69.
41. Doulut, S., M. Rodriguez, D. Lugin, F. Vecchini, P. Kitabgi, A. Aumelas, and J. Martinez. 1992. Reduced peptide bond pseudopeptide analogues of neurotensin. *Pept. Res.* 5: 30–38.
42. Evers, B. M., J. Ishizuka, D. H. Chung, C. M. Townsend, Jr., and J. C. Thompson. 1992. Neurotensin expression and release in human colon cancers. *Ann. Surg.* 216: 423–430, discussion 430–431.
43. Martin, S., V. Navarro, J. P. Vincent, and J. Mazella. 2002. Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology* 123: 1135–1143.
44. Haase, C., R. Bergmann, J. Oswald, D. Zips, and J. Pietzsch. 2006. Neurotensin receptors in adeno- and squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 26(5A): 3527–3533.
45. Peirson, S. N., J. N. Butler, and R. G. Foster. 2003. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res.* 31: e73.
46. Frade, J. M., A. Rodríguez-Tébar, and Y. A. Barde. 1996. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383: 166–168.
47. Pearce, R. N., S. L. Swendeman, Y. Li, D. Rafii, and B. L. Hempstead. 2005. A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood* 105: 4429–4436.
48. Heikal, Y., M. P. Woll, T. Fox, K. Seaton, R. Levenson, and M. Kester. 2011. Neurotensin receptor-1 inducible palmitoylation is required for efficient receptor-mediated mitogenic-signaling within structured membrane microdomains. *Cancer Biol. Ther.* 12: 427–435.
49. Zlei, M., S. Egert, D. Wider, G. Ihorst, R. Wäsch, and M. Engelhardt. 2007. Characterization of in vitro growth of multiple myeloma cells. *Exp. Hematol.* 35: 1550–1561.
50. Wang, J. G., N. N. Li, H. N. Li, L. Cui, and P. Wang. 2011. Pancreatic cancer bears overexpression of neurotensin and neurotensin receptor subtype-1 and SR 48692 counteracts neurotensin induced cell proliferation in human pancreatic ductal carcinoma cell line PANC-1. *Neuropeptides* 45: 151–156.
51. Myers, R. M., J. W. Shearman, M. O. Kitching, A. Ramos-Montoya, D. E. Neal, and S. V. Ley. 2009. Cancer, chemistry, and the cell: molecules that interact with the neurotensin receptors. *ACS Chem. Biol.* 4: 503–525.
52. Dicou, E. 2008. Neurotensin protects pancreatic beta cells from serum deprivation. *Arch. Physiol. Biochem.* 114: 299–300.
53. Coppola, T., S. Béraud-Dufour, A. Antoine, J. P. Vincent, and J. Mazella. 2008. Neurotensin protects pancreatic beta cells from apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40: 2296–2302.
54. Béraud-Dufour, S., T. Coppola, F. Massa, and J. Mazella. 2009. Neurotensin receptor-2 and -3 are crucial for the anti-apoptotic effect of neurotensin on pancreatic beta-TC3 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41: 2398–2402.
55. Gendron, L., A. Perron, M. D. Payet, N. Gallo-Payet, P. Sarret, and A. Beaudet. 2004. Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling: internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Mol. Pharmacol.* 66: 1421–1430.
56. Qasem, A. R., C. Bucolo, M. Baiula, A. Spartà, P. Govoni, A. Bedini, D. Fasci, and S. Spampinato. 2008. Contribution of alpha4beta1 integrin to the antiallergic effect of levocabastine. *Biochem. Pharmacol.* 76: 751–762.
57. Mraz, M., C. S. Zent, A. K. Church, D. F. Jelinek, X. Wu, S. Pospisilova, S. M. Ansell, A. J. Novak, N. E. Kay, T. E. Witzig, and G. S. Nowakowski. 2011. Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin α 4 β 1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br. J. Haematol.* 155: 53–64.
58. Furman, R. R., Z. Asgari, J. O. Mascarenhas, H. C. Liou, and E. J. Schattner. 2000. Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Immunol.* 164: 2200–2206.
59. Magazian, M., E. Poszepczynska-Guigné, M. Bagot, L. Boumsell, C. Pruvost, P. Chalon, J. M. Culoucou, P. Ferrara, and A. Bensussan. 2004. Sezary syndrome cells unlike normal circulating T lymphocytes fail to migrate following engagement of NT1 receptor. *J. Invest. Dermatol.* 122: 111–118.

Résultats II – Interactions des récepteurs NTSR2 et TrkB dans la survie lymphocytaire B

Neurotensin receptor 2 and TrkB interactions in B lymphocyte survival.

Saada S, Abbaci A, Naves T, Wilson C, Troutaud D, Lalloué F, Jaccard A, Bordessoule D, Fauchais AL, Jauberteau MO

En préparation pour soumission

La constatation d'une augmentation de l'expression transcriptionnelle de NTSR2 au niveau des cellules de patients atteints de LLC nous a conduits à rechercher la fonction de ce récepteur à la neurotensine dans des modèles de lignées B humaines transfectées pour surexprimer NTSR2. La surexpression de NTSR2 induit l'activation transcriptionnelle de TrkB, autre récepteur exprimé par ces lignées comme par les cellules de LLC de patients.

La colocalisation de ces 2 récepteurs a été identifiée par microscopie confocale et immunoprécipitation. Ce complexe protéique induit l'activation des voies de signalisation ERK, p38MAPK et JNK, après traitement par le BDNF, le ligand de TrkB. L'inhibition de NTSR2 par un antagoniste de NTSR1/2 diminue l'activation de ces voies de signalisation. Ces données suggèrent un phénomène de transactivation entre ces 2 récepteurs, dépendant des métalloprotéases, l'inhibition de ces dernières conduisant à une diminution de l'activation induite par le BDNF.

La localisation membranaire de ce complexe protéique est maintenue par le Dynosore, qui inhibe son internalisation en bloquant les dynamines.

Le trafic intra-cellulaire endosomal de ce complexe apparait perturbé dans les cellules surexprimant NTSR2, ce qui pourrait conduire à son accumulation comme cela est détecté dans les cellules de LLC. Ces cellules leucémiques se caractérisent également par une production d'exosomes contenant le complexe TrkB/NTSR2, sécrété en extra-cellulaire et retrouvé en excès dans le plasma des patients en comparaison à des témoins volontaires sains.

Ces résultats mettent en évidence la formation d'un complexe de signalisation impliquant NTSR2 et TrkB dans les cellules de patients atteints de LLC dont les

conséquences physiopathologiques pourraient induire la persistance d'une signalisation de survie cellulaire lymphocytaire B.

Neurotensin receptor 2 and TrkB interaction in B lymphocyte survival.

Saada S¹, Abbaci A¹, Naves T¹, Wilson C¹, Troutaud D¹, Lalloué F¹, Jaccard A⁴, Bordessoule D⁴, Fauchais AL^{1,2}, Jauberteau MO^{1,3}

University of Limoges, Equipe Accueil 3842¹, Departments of Internal Medicine², Immunology³ and Clinical Hematology⁴, University Hospital, Limoges, France.

Abstract:

BDNF (*Brain-Derived Factor Neurotrophin*) is a neurotrophin involved in cell survival, proliferation and differentiation especially *via* its interaction with TrkB «*Tropomyosin Receptor kinase B*», a Tyrosine Kinase Receptor (TKR). We previously demonstrated that a BDNF/TrkB autocrine survival loop is induced by stress culture conditions in pre-B, mature, and plasmacytic malignant B cell lines. The BDNF secretion is linked to a Vps10-Domain protein, sortilin, also called Neurotensin Receptor-3 (NTSR3). Neurotensin, another neuropeptide growth factor, and its two other high and low affinity G-protein coupled receptors (G-PCR), NTSR1 and NTSR2 respectively, are expressed by human B-cell lines. Nevertheless, neurotensin is undetected in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) patient's cells that overexpressed NTSR2 in comparison to normal B cells.

In this study, the overexpression of NTSR2, induced by transfection in mature B-cell lines, triggers an increase in TrkB expression. These two receptors, co-localized on B-CLL, form a functional RTK-GPCR complex, activated by BDNF, on both B-CLL and B- overexpressing NTSR2 cell lines. This NTSR2-TrkB complex enhances several survival signaling pathways (ERK, p38MAPK and JNK), depending on metalloproteases activation, following BDNF binding. Furthermore, dynasore could block the internalization of the RTK-GPCR complex thus maintaining this complex at the plasma membrane, consequently its degradation. Indeed, dynasore enhanced JNK activation. In NTSR2-overexpressing cells, sucrose gradient analysis showed the internalization of this complex. NTSR2 was expressed in early (EAA1 positive) and late (Rab7 positive) endosomes. The endosomal trafficking, disturbed in NTSR2 overexpressing cells, is restored by BDNF treatment. Furthermore, NTSR2-overexpressing cells are characterized by a decreased in sortilin expression which could limit the lysosomal degradation of NTSR2-TrkB complex resulting in the release of exosomes expressing high levels of this signaling platform.

These results point out a new function for NTSR2 receptor on B cell homeostasis and endosomal trafficking that may be involved in B cell oncogenesis.

Key words: B-cell chronic lymphocytic leukemia, BDNF, neurotensin, NTSR2

Introduction:

Neurotrophins and neurotensin are neurotrophic growth factors/neuropeptides initially described in nervous system [1, 2]. However, their expression and function were extended to other tissues, notably in solid cancers [1, 2]. Nevertheless, in B lymphocytes, the function of the neurotrophin BDNF (*Brain-Derived-Neurotrophic Factor*) was identified as an autocrine survival loop depending on its endogenous secretion associated with the overexpression of TrkB, a high affinity tyrosine kinase receptor (TKR) at the cell membrane [3-5]. Their involvement in malignant disease was evidenced in myeloma demonstrating that endogenous TrkB/BDNF signaling loop is a major axis in myeloma aggressiveness [4].

However, BDNF transport and release depends on sortilin, its protein transport. The presence of sortilin was previously shown in B cell lines at different stages of B cell maturation as well as in normal circulating B-lymphocytes for healthy donors [5]. Indeed, as sortilin is the third receptor for neurotensin, we have previously searched and identify its endogenous secretion and the expression of the two other receptors belonging to G protein-coupled receptors (GPCR), NTSR1, described as the high affinity receptor for neurotensin, and NTSR2, corresponding to the lower affinity receptor [6]. The investigation of NTSRs and neurotensin was performed in normal, chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and lymphoma B-cells and assessed that B-CLL patient's cells drastically overexpressed the NTSR2 receptor whereas NTSR1 and sortilin were strongly diminished and neurotensin was undetectable [6]. While NTSR1 were frequently described to be involved in several solid cancers such as pancreatic, breast or lung cancers, such implication of NTSR2 in malignant disease was rarely reported except in prostatic [7] and colonic cancers [8], but never in onco-hematological disease. Given that our previous studies assessed that the NTSRs/neurotensin functions are overlapping to those of TrkB/BDNF in B cell survival, notably in stress apoptotic conditions, their fine tuning interactions could be hypothesized, notably in regards to NTSR2, the GPCR receptor found to be overexpressed in B-CLL whereas its ligand neurotensin was repressed.

In this study, in experimental conditions leading to an overexpression of NTSR2 as described in B-CLL, we assessed that TrkB and NTSR2 interact through a protein complex signaling maintained at the cell membrane of B lymphocytes. This TrkB/NTSR2 complex is activated through the BDNF, the TrkB ligand, and depends on NTSR2 and metalloproteinases. The cell trafficking and secretion of these two receptors are also characterized in transfected B cells and revealed that NTSR2 overexpression induces a deregulation of endosomal trafficking of this receptor associated to an exosomal secretion of TrkB/NTSR2 complex, detected in B-CLL patients.

Results:

Transcriptional interaction between NTSR2 and TrkB

Given that we had previously demonstrated that unlike the B cells from healthy donors, B cells from CLL patients did not express neurotensin transcript [6] but showed a significant overexpression of NTSR2 whilst TrkB expression was unperturbed in the disease situation (**Figure 1A**). In contrast, the expression of sortilin/NTSR3 was significantly downregulated in B-CLL compared to healthy donors (**Figure 1A**). Taking these results observed for B-CLL, we focused our study to determine the respective function of neurotensin, the NTSR2 ligand and BDNF, the TrkB ligand in B cells overexpressing NTSR2.

In order to search for a potential interaction between NTSR2 and TrkB, NTSR2 overexpression models were established by transfection with a NTSR2 vector inducing an overexpression in one human mature B cell line, BL41. The efficiency of the NTSR2 transfection was evaluated by qRT-PCR using NTSR2 probes at 24 hours. Interestingly, TrkB transcripts were increased in these cells induced by NTSR2 overexpression (**Figure 1-B1**). To analyze the relationship between NTSR2 overexpression and TrkB up regulation, BL41 cells were also transfected with the TrkB expression vector for 24 hours, and analyzed by qRT-PCR. The results show a significant up regulation of NTSR2 transcript levels upon TrkB-FL overexpression (**Figure 1-B2**). In contrast, overexpression of NTSR2 significantly down regulated the expression of both sortilin and NTSR1 (**Figure 1C and 1D**) which was similar to that observed with B-CLL (**Figure 1A**) (**Figure 1. Supplementary data**). These results confirm that we are able to recapitulate the B-CLL disease condition using this *in vitro* NTSR2 expression model.

NTSR2 and TrkB are colocalized interacting as a protein complex in BL41 cells and in CLL patients

Since NTSR2 expression induces an up-regulation of TrkB, the relationship between NTSR2 and TrkB expression was analyzed on BL41 cell line co-transfected by both NTSR2 and TrkB overexpressing vectors. The co-expression of these two receptors was confirmed by immunoprecipitation of TrkB followed by NTSR2 immunoblotting (**Figure 2A**). Confocal microscopy revealed that NTSR2 and TrkB were co-localized (**Figure 2B**). Therefore, to address the function of TrkB/NTSR2, signaling activation was then studied.

NTSR2-TrkB interaction, BDNF and neurotensin expression regulation:

We detected herein that B-CLL patients' cells expressed significantly higher BDNF transcript levels than observed in healthy B cells (**Figure 2C**). Whilst neurotensin transcript levels were undetectable in B-CLL patients compared to healthy donors (**Figure 2C**). According to these data, we next determined the neurotensin and BDNF protein levels by ELISA in the plasma from B-CLL patients and healthy donors. Indeed, whereas BDNF levels in B-CLL patients' plasma were significantly higher than those of healthy donors (**Figure 2D**), neurotensin plasma levels were significantly decreased in CLL patients in comparison to healthy donors (**Figure 2E**). Indeed, the functional effect of BDNF or neurotensin on B-lymphocytes overexpressing NTSR2 was next investigated.

NTSR2 overexpression increases the survival signaling pathways induced by BDNF:

To explore the signaling pathways stimulated by the TrkB/NTSR2 complex, human phospho-MAPK proteome array was used to evaluate the effect of BDNF (100 ng/mL) and neurotensin (40 μ M), treatment on BL41 cells transfected by NTSR2 vector, in comparison to the empty vector control. Relative levels of protein phosphorylation were quantified by the ratio between phosphorylated protein and total protein for either BDNF or neurotensin treatments. Comparisons were also performed with untreated control cells (PBS). All data were normalized to the endogenous array according to the manufacturer instructions, and the phosphorylation ratio of BL41 transfected empty vector cells (BL41-EV), and BL41 transfected NTSR2 expression vector cells (BL41-NTSR2) were determined (**Figure 3A and B**).

Our results showed a specific decrease of Akt phosphorylation in NTSR2-overexpressing cells, after BDNF treatment (**Figure 3A**). Interestingly, BDNF enhances the c-Jun N-terminal Kinase (JNK) and p38-MAP Kinase phosphorylation, in the NTSR2-overexpressing cells (**Figure 3A**), whereas no significant change was observed for ERK activation (**data not shown**). By contrast, no significant difference on these signaling pathways was observed between NTSR2 overexpressing cells and control ones after neurotensin exposure (**Figure 3B**).

Together, these results suggest that BDNF treatment could induce an increase of survival signaling pathways through NTSR2/TrkB complex depending on JNK and p38MAPK activation.

To verify the functional effects of BDNF on BL41-overexpressing NTSR2 cells survival, we evaluated their apoptotic levels by cytoplasmic soluble nucleosomes quantified by ELISA. After a 24-hour culture on basal conditions (10% FCS), the basal apoptosis is significantly reduced by the overexpression of NTSR2 receptor (**Figure 3C**). This protective effect of NTSR2 was enhanced by BDNF treatment (**Figure 3C**). These results confirm the protective effect of BDNF on NTSR2-overexpressing cells; however these cells were more sensitive to the stress-induced apoptosis induced by serum privation culture in the absence of BDNF (**Figure 3D**).

BDNF promotes TrkB/NTSR2 complex signaling depending on metalloprotease activity and its internalization:

To analyze the TrkB/NTSR2 signaling complex, the pharmacological inhibitor SR142978A (for both NTSR1/NTSR2) was used in overexpressing NTSR2 conditions for 24 hours in BL41 cells as well as in Mec1 B-cell line, another NTSR2-expressing B-CLL cell line [9] (**Figure 2 supplementary data**). The activation induced by BDNF was decreased by the inhibitor (67nM). Indeed, after 24 hours, without inhibitor, the ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation ratio, were enhanced in NTSR2-overexpressing cells compared to the empty vector and diminished by SR 142978A in presence of BDNF (**Figure 4A**). According to the Kinase proteome profile results (**Figure 3A**), the Akt activation was decreased in NTSR2-overexpressing cells treated by BDNF (**Figure 3A**) as well as in presence of NTSRs inhibitor. These results suggest that BDNF induces ERK1/2 and p38MAPK activation survival signaling pathways through TrkB/NTSR2 signaling platform.

Given that RTK/RCPG signaling platform may involve metalloprotease (MMP) activity [10-12], we searched for MMP interaction with TrkB/NTSR2 activation by using a broad-spectrum MMP inhibitor. Interestingly, a 1-hour pre-treatment of cells by the MMP inhibitor GM6001 (10 μ M) decreases the activation of p38MAPK (**Figure 4A**). Conversely, the Akt activation is enhanced by GM6001-pretreatment alone or in BDNF-treated cells (**Figure 3 supplementary data**). This data contrasts with the decrease of Akt activation obtained in NTSR2-overexpressing cells in the absence of GM6001. In addition, ERK1/2 and p38MAPK signaling activations were diminished after GM6001 pretreatment (**Figure 4A and Figure 3 supplementary data**). These results suggest that MMP could be involved in Akt inhibition besides ERK and p38MAPK activation of the TrkB/NTSR2 complex. Therefore, a MMP regulation of TrkB/NTSR2 complex could be hypothesized.

In order to determine the consequences of RTK/GPCR internalization, we have evaluated the effect of dynasore, an inhibitor of dynamin activity implicated in the internalization of protein complex before its degradation [13, 14] according that dynamin inhibition induces the blockage of the GPCRs internalization [15-17] after its activation and therefore its degradation [18-20]. The cell treatment by dynasore (40 μ M) importantly induces an increase of JNK phosphorylation in NTSR2-overexpressing cells, indicating an increase of signaling activation with or without BDNF treatment (**Figure 4C**). This could reflect a persistent signaling induction, hypothesizing degradation/recycling is perturbed thus maintaining TrkB/NTSR2 complex at the plasma membrane. In order to verify this hypothesis we searched for NTSR2 localization to the endosomal compartment.

NTSR2 is localized to the endosomal compartment and also regulates sortilin/NTSR-3 expression:

The endosomal compartment analysis showed different distribution of NTSR2, especially co-expressed with EAA1 protein, localized to the early endosome compartment, and also with Rab7 protein, localized to the late endosome. Some differences were observed depending on the NTSR2 overexpression especially after BDNF treatment (**Figure 5A**). In the absence of BDNF treatment, we detected, in NTSR2-overexpressing cells, an altered distribution of the late endosome/multivesicular bodies (MVB) that could affect the endosomal-CD63 localization in the later fractions. BDNF treatment of NTSR2-overexpressing cells restored the endosomal trafficking. These results could signify that NTSR2 overexpression without BDNF induces a blockage of the endosomal traffic towards the lysosomes. Interestingly, we observed a shift on NTSR2 fraction localization with BDNF treatment (**Figure 5B**, fraction 3, indicated by *); this shift is also associated with a slight change of the molecular weight of NTSR2 (**Figure 5B**, fraction 3, indicated by *) which could be due to a post-transcriptional modification such as phosphorylation reflecting a specific effect of BDNF treatment on the NTSR2 receptor or NTSR2/TrkB co-receptor (**Figure 5B**).

However, we have previously observed that B cells overexpressing NTSR2 showed a decrease in the expression of the sortilin, in particular in the B cells from CLL patients (**Figure 1A**), whereas sortilin/NTSR3 is known to be expressed in B lymphocytes [5, 6]. Accordingly, this vacuolar protein sorting 10 domain (Vps10D) receptor plays a crucial function in B cell homeostasis and in the intracellular vesicle trafficking between the trans-Golgi networks (TGN) and endosome compartments and participates in lysosome sorting [21-24]. In another hand, sortilin is essential for intracellular sorting in immune cells, participating in destroying antigens by monocytes phagolysosomes [25]. Our results show a significant decrease of sortilin expression in NTSR2-

overexpressing B cell lines, as in patients' CLL B cells, overexpressing this receptor (**Figure 1A and 1C**). It was hypothesized that a defect of the intracellular trafficking in this model could be involved in a defect of degradation of TrkB/NTSR2 complex, leading to a continuous induction and increase of survival signaling pathways activation. Therefore, given that sortilin expression is decreased in both NTSR2-overexpressing and CLL patients' cells and that endosomal traffic to lysosomal road is reestablished in presence of BDNF, we studied exosome secretion in NTSR2-overexpressing cells and in B cells from CLL patients.

NTSR2 and TrkB are expressed in B lymphocytes supernatant and serum-derived exosomes:

Exosomes are small vesicles biologically active, derived from the MVB compartment and released by many cellular types [26, 27]. Previous works shows an up-regulation of sortilin on macrophages and dendritic cells (antigen presenting cells: APCs) [25, 28]. To analyze the effects of the sortilin down regulation induced by NTSR2 overexpression, sortilin and NTSR2 expressions were analyzed in exosomes. The supernatant of B cell lines and B-CLL patients' cells were cultured 24h in exosome-free medium. The B-CLL cells were stimulated by BCR activation and IL-4 as previously described [6]. Exosomes were isolated by differential centrifugation and analyzed by Western blotting. The exosome extraction was verified by flotillin-1 exosomal marker enrichment after differential centrifugation (**Figure 6A**). The results demonstrated the expression of sortilin in exosomes released by B lymphocytes, and showed that the expression of sortilin was increased on B-CLL-derived exosomes was more important than the unstimulated B-CLL exosomes-derived ones (**Figure 6A**). Sortilin is also expressed in exosomes derived from BL41 cell line. NTSR2, overexpressed in the B-CLL cells, is also overexpressed in exosomes derived from B-CLL cells (**Figure 6A**). Interestingly, NTSR2 and TrkB were expressed both in serum-derived exosomes of healthy donors and B-CLL patients. Both NTSR2 and TrkB expression were higher in serum-derived exosomes of B-CLL cells (**Figure 6B**). In parallel, TrkB/NTSR2 complex was detected in the serum derived-exosomes from healthy donors and B-CLL patients (**Figure 6C**). These two receptors, detected and co-expressed in the B lymphocytes, were also conserved and protected from degradation in B cells, and also released in exosome microvesicles (**Figure 6D**), suggesting a functional role in the B cell oncogenesis and leukemogenesis. The failure to degrade this complex after internalization in B-CLL cells, leads to their release in exosomes, which may participate in the cell-to-cell communication in CLL pathology.

Discussion:

The implication of BDNF on B cell homeostasis had previously been demonstrated, acting as an autocrine loop promoting survival in apoptotic-induced conditions. This regulation was depending on the TrkB activation through BDNF binding, both higher expressed in these conditions [4, 5]. The high and low affinity receptors TrkB and p75^{NTR} respectively have been found in human transformed B-lymphocytes and B-cell lymphomas [29]. The significance of this expression was demonstrated by the cell survival/death balance of B cells [5]. Indeed, p75^{NTR} may heterodimerize with the vacuolar protein sorting domain protein (Vps10-D) protein named sortilin, as its coreceptor for the binding of the immature ligand, pro-BDNF to induce apoptosis [30, 31]. We have previously demonstrated the expression of sortilin by B lymphocytes and its implication on the apoptotic effect of pro-BDNF [5]. It

is noteworthy that sortilin, also named neurotensin receptor-3 (NTSR3), may bind a neuropeptide, the neurotensin [32]. Neurotensin regulated cell homeostasis and showed to promote cell survival in many cellular models and tissues (for review [2]). It promotes cell survival and tumor progression of many solid cancers [2, 33]. The neurotensin effects on cancer cells have been described, for the most part associated to the high affinity neurotensin receptor, NTSR1 [34]. The binding of neurotensin to this GPCR NTSR1 induces intracellular survival PKC, ERK1/2 and MAPK pathways [34]. We demonstrated, in a previous work that the GPCR Neurotensin receptors, NTSR1 and NTSR2 were expressed in B lymphocytes whatever the development stages [6]. Neurotensin induces proliferation and anti-apoptotic effects depending on the presence of NTSR1 and its functions were inhibited by SR48692 or Meclizine[®]. We have shown that sortilin was colocalized with NTSR1 to the plasma membrane of B lymphocytes, under stress culture conditions, promoting the neurotensin binding [6]. Remarkably, high transcript levels of NTSR2 were exclusively overexpressed in B cells of CLL patients, whereas NTSR1 and sortilin were strongly decreased and neurotensin undetectable. However, TrkB expression was similarly maintained in B-CLL to those of normal B cells. Therefore, these data allowed to hypothesize that NTSR2 could be activated independently of NTSR1 and neurotensin. The function of NTSR2 was already uncertain except in a study reporting its anti-apoptotic effect in a pancreatic cell line, induced by neurotensin, depending on a functional complex of NTSR2 with sortilin, co-localized to the plasma membrane [35]. The NTSR2 expression in cancer cells was rarely reported, except its overexpression in cell lines and differentiated malignant tumors of prostatic cancer [7]. The function of NTSR2 in malignant cells still remains to be determined. Hence, we established a B cell model overexpressing NTSR2 to study its function and interactions with another partner, TrkB, coexpressed in B cell line as in B-CLL patients. Of note, the NTSR2 overexpression induces the downexpression of NTSR1 and sortilin, similarly to those detected in B lymphocytes from CLL patients. We confirmed the implication of NTSR2 on the activation of intracellular pathways. These effects resulted in the association of NTSR2, with the Tyrosine Kinase receptor, TrkB. These two receptors were mutually regulated together at the transcriptional level. The TrkB/NTSR2 complex forms an active RTK/GPCR complex, which can activate survival signaling pathways p38MAPK, Erk1/2 and JNK. According to other RTK-GPCR platform studies [36-40], the activation of signaling pathways after BDNF treatment suggests a TrkB-mediated NTSR2 transactivation, not yet reported. By contrast, an activation of NTSR2 induced by neurotensin was demonstrated in beta-TC3 pancreatic cell line and in prostatic cancer cells [7, 35]. However, in the B cells overexpressing NTSR2 as in B-CLL patients, the neurotensin expression is drastically diminished compared to those of BDNF. In addition, the plasma of CLL patients is marked by low concentration of neurotensin while BDNF is highly expressed.

An interaction of TrkB and G proteins activation was previously evoked in astrocytes but non characterized [41]. The RTK/GPCR complex implicating neurotrophin receptors was previously studied. TrkA may interact with LPA (Lyso-Phosphatidate receptor), a GPCR type receptor. The complex TrkA/LPA is activated by the TrkA ligand, NGF (Nerve Growth Factor), while the GPCR inhibition shows a decrease of MAPK signaling [42, 43].

We also showed in this study, a TrkB/NTSR2 intracellular endosomes trafficking disruption, in NTSR2 overexpressing cells and its re-establishment to the formation of late endosomes after BDNF treatments. The NTSR2 overexpression on B-cell model is associated to a negative regulation of sortilin expression. This protein, associated to the endosomal compartment trafficking [44], was shown in our team associated to the endosomal sorting and trafficking, particularly in the addressing

to the exocytosis, as exosome microvesicles [45]. The *in vitro* NTSR2 overexpression rat models were analyzed and showed an internalization of this receptor after neurotensin treatment that was required for ERK1/2 signaling activating [46]. Our results displayed endosomal localization of human NTSR2, and a shift in the endosomal localization of NTSR2 to endosomal compartments after BDNF treatment. It colocalizes with early and late endosome, EEA-1 and Rab7 respectively, but shows a shift to a new compartment, that remains CD63 positive in the sucrose gradient, known to be the multivesicular bodies (MVBs), and also the exosome marker. The RTK/GPCR complex activation was described to induce a c-Src proto-oncogene recruitment, regulated by the G-proteins (α sub-unit) participates to the β -arrestin and dynamin, inducing endocytosis of the RTK/GPCR receptor complex [15-17, 47, 48].

GPC-Receptors internalization in the endosomal compartments is followed by their ubiquitination in the MVBs organelles and sorting to the lysosome compartment, to be degraded [49-51]. This sorting and protein loading into vesicles is a complex cellular process led by ESCRT machinery (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) [49, 50, 52, 53]. The small GTPase Rab7 participates to the endolysosomal trafficking, and considered as a late endosome marker [54, 55]. Our data showed that NTSR2 co-expression with Rab7 is decreased after BDNF treatment, despite its co-expression with the CD63 MVBs marker. The high amounts of NTSR2 protein in B-CLL cells could reflect its accumulation in the endosomal compartment. Protein accumulation in the intracellular compartments and their oligomerization could protect them from degradation. These proteins could aggregate and accumulate in intraluminal vesicles (ILVs), promoting the MVBs fuse with the plasma membrane and ILV secretion *via* exosomes. This mechanism has been shown especially with the accumulation of MHC-II molecules in activated B lymphocytes [27, 56]. In this work, we demonstrated that NTSR2 was expressed in exosomes derived from B-CLL patients. In addition, the TrkB/NTSR2 complex was maintained and released by cells in exosomes, found in oncogenic B cells from CLL patients. In a previous study, we have recently demonstrated a new function of sortilin in intracellular vesicles trafficking. Sortilin was showed to be associated to Tyrosine kinase receptors (TrkB and EGFR), forming complex termed TES (TrkB-EGFR-Sortilin) and was implicated in endosomal trafficking especially in exosomes releasing [45]. This complex released by oncogenic cells mediates communication and signaling events between oncogenic cells and their tumor microenvironment [45]. The TrkB/NTSR2 complex is also a survival-signaling complex, may be exchanged by oncogenic cells to maintain cell survival. However, further analysis of the NTSR-2 and TrkB/NTSR-2 complex function and regulation needs to be established to completely understand NTSR2 functions particularly in B lymphocytes.

Legends of the figures:

Figure 1: Transcriptional co regulation of NTSR2 and TrkB in B lymphocytes:

(A)- qRT-PCR analysis of neurotensin receptor-2 (NTSR2), TrkB, Sortilin (or NTSR3) and neurotrophic receptor p75^{NTR} in resting (n = 5, black histogram) B cells and chronic B cell leukemia (B-CLL) (n = 5 or more, white histogram). Data are expressed as means of Fold Expression (relative quantities or RQs) values +/- SEM of each gene in comparison with non-activated normal B cells normalized to an arbitrary value of 1. **(B.1 and B.2)** qRT-PCR analysis of NTSR2 (B.1) and TrkB (B.2), in BL41 cell line transfected with NTSR2 expression vector (B.1) or TrkB expression vector (B.2), compared to empty

vector (EV) transfected cells. **(C and D)** qRT-PCR analysis of sortilin (C) and NTSR1 (D) in BL41 cell line transfected with NTSR2 expression vector. Data are expressed as means of Log2 of Fold Expression (Log2 RQs) values \pm SEM, and normalized to an arbitrary value of 0, representing the basal expression of NTSR-2 and TrkB in Empty Vector transfected cells. All gene expressions were normalized with the housekeeping gene HPRT expression. Significant “*p*” values are indicated in the graphs and calculated from dCt values with ANOVA tests.

Figure 2: TrkB-NTSR2 colocalization and their ligands expression BDNF and Neurotensin respectively:

(A)- Western-blot analysis with anti-NTSR2, after immunoprecipitation of TrkB from whole cell lysate of B cells from CLL patients (B-CLL), and BL41 cell lines co-transfected with NTSR2 and TrkB expression vectors. **(B)**- Confocal microscopy analysis of NTSR2 (green) and TrkB (red) and their co-localization (yellow staining, in the merge image) in B-cells from CLL patient. **(C)**- qRT-PCR analysis of the neurotensin and BDNF expression in B cells from healthy donors (*n* = 5, black histogram), and chronic B cell leukemia (B-CLL) (*n* = 5, white histogram). Data are expressed as mean of Fold Expression (relative quantities or RQs) values \pm SEM of each gene in comparison with non-activated normal B cell normalized to an arbitrary value of 1. Concentration of BDNF **(D)** and neurotensin **(E)** detected and quantified by ELISA tests in CLL patients (grey boxes) and healthy controls plasma (white boxes). The boxes represent the 50th percentile, the bars outside the boxes show the 10th and 90th percentiles, and the horizontal black lines represent the median, and significant differences were assessed with non-parametric Mann-Whitney tests.

Figure 3: Signaling pathway activation by BDNF or neurotensin on BL41 overexpressing NTSR2:

A human phospho-MAP-Kinases array was used to analyze and quantify signaling pathway activation and phosphorylation ratio after 24 hour treatment of neurotensin (40 μ M) vs PBS or BDNF (100ng/ml) vs PBS, NTSRs and TrkB ligands respectively. Approximately, 300 μ g of protein by condition were used according to the manufacturers recommendations **(A)**- Histograms representing phosphorylation state ratio between neurotensin and PBS treatment of BL41 cells transfected with Empty Vector (white histograms) compared to BL41 cells transfected with NTSR2 vector ratio (black histograms). **(B)**- Histograms representing phosphorylation state ratio between BDNF and PBS treatment of BL41 cells transfected with Empty Vector (white histograms) compared to BL41 cells transfected with NTSR2 vector ratio (black histograms). Values represent a mean of four plot quantified phosphorylation state Ratio \pm SEM of each MAP-Kinase. Significant “*p*” values indicated in the graph are calculated by phosphorylated protein ratio (Treatment/PBS) for each transfected cells (Empty vector and NTSR2 vector) and evaluated with ANOVA tests.

To analyze the survival effect of BDNF on NTSR-2 overexpression cells, basal apoptosis was evaluated on BL41 cells transfected with Empty Vector (white histograms) or NTSR-2 expression vector (black histograms), after 24 hours of BDNF (100ng/mL) or PBS treatments in the basal culture conditions (10% FCS) **(C)**. Stress induced apoptosis was evaluated by 24 hours of culture without fetal calf serum (0% FCS) as previously described. BL41 Empty vector or NTSR2 expression vector transfected cells

were cultivated under BDNF (100ng/mL) treatment or PBS as control **(D)**. Apoptotic ratio was evaluated by ELISA nucleosomes detection and quantification, in each condition compared to the non-treated empty vector transfected cells. Significant “*p*” values indicated in the graphs were calculated by comparison of apoptotic ratios, and evaluated with ANOVA tests.

Figure 4: TrkB/NTSR2 complex signaling and internalization metalloproteases-dependent:

BDNF effects on signaling pathways in B cells overexpressing NTSR2 were analyzed by NTSRs blockage with SR142978A (67nM) for 24 hours, BL41 transfected cells **(A)** or Mec-1 cells **(B)** with NTSR2 expression vector or with empty vector were cultured with or without 100 ng/mL of BDNF, for 24 hours. The implication of metalloproteases on the complex activation was assessed by pre-treatment of cells by a metalloprotease inhibitor GM6001 (10μM) or DMSO as negative control, before BDNF or PBS addition. Signaling protein activation values were evaluated by phosphorylated ERK intensity on total protein ratio (A and B). **(C)** Internalized signaling of the TrkB/NTSR2 complex was evaluated for 2 hours BDNF treatment with or without NTSR2 overexpression in Mec-1 (left hand panels) or BL41 cells (right hand panels). The dynamin inhibitor, dynasore (40μM) was added to block complex internalization and degradation after treatment. Endosomal signaling activation was assessed by Jun Kinase (JNK) phosphorylation. Values represent phosphorylated on total proteins Ratio for each condition.

Figure 5: Endosomal compartment of NTSR2 and sortilin expression regulation:

(A and B)- The localization of NTSR2 to the endosomal compartments was analyzed, after transfection of the BL41 cell lines with NTSR2 expression vector (B) or empty vector (A). Cells cultured for 24 hour and after, treated (blots on right) or not (blots on left) with BDNF (100ng/mL) for 2 hours. Cells were re-solubilized in gradient buffer. Samples were nuclei-free after centrifugation (1000xg for 15min) and loaded on a 5 – 25% sucrose gradient (w/v) in gradient buffer, and centrifuged at 40,000xg for 18 hours. Seven fractions were harvested plus pellet material after centrifugation and analyzed by SDS-PAGE. The presence of NTSR2 in the early and late endosomes was assessed by using anti-NTSR2, anti-EEA-1 and anti-Rab7 respectively. All endosomal compartments were confirmed with the anti-CD63 antibody.

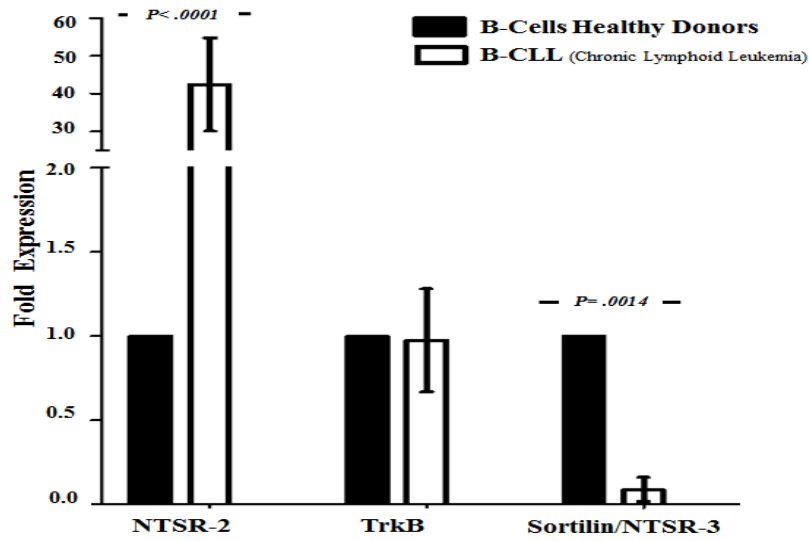
Figure 6: NTSR2 and TrkB expressed in CLL serum and B cells supernatant exosomes:

Exosome release was assessed for the BL41 cell lines and in B-CLL supernatants. BL41 cells were cultured 24 hours in exosome-free medium, B-CLL were stimulated for 24 hours and cultivated in exosome-free medium. A total volume of 10 mL of supernatant was harvested for each condition and exosomes were isolated by differential centrifugation or from 1mL of CLL patients’ serum. After a wash in PBS, exosomes were solubilized in 30μL of RIPA lysis buffer. **(A)-** 10 μg of exosome proteins from BL41, stimulated and unstimulated B-CLL, were analyzed by Western blotting with an anti-Sortilin and anti-NTSR2, an anti-Flotillin-1 was used as a exosome marker. **(B)-** 10 μg of exosome proteins from two healthy donors and two B-CLL patient serums, analyzed by anti-TrkB, anti-NTSR2

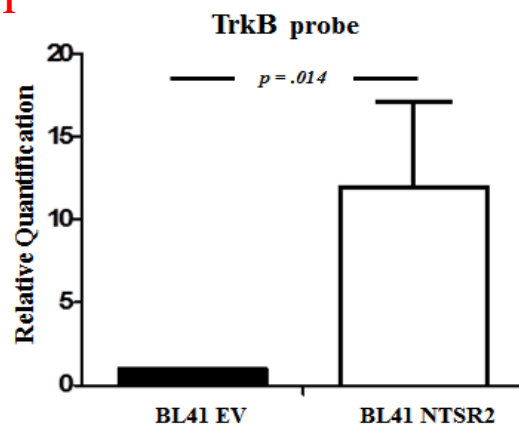
and exosome marker Flotillin-1. **(C)**- The whole exosomes from two serum donors and two serum CLL patients were solubilized in 500 μ L of immunoprecipitation buffer. Anti-NTSR2 was used for the immunoprecipitation of NTSR2 from exosomes and the precipitated proteins were analyzed by Western blotting using an anti-TrkB. **(D)**- Exosomes from two B-CLL supernatant cultures and the exosomes derived from serum of the same patients were solubilized in 500 μ L of immunoprecipitation buffer, anti-TrkB was used for the exosome TrkB immunoprecipitation and TrkB presence was verified by TCA precipitation of the proteins followed by Western blot analysis using an anti-TrkB.

Figure 1 :

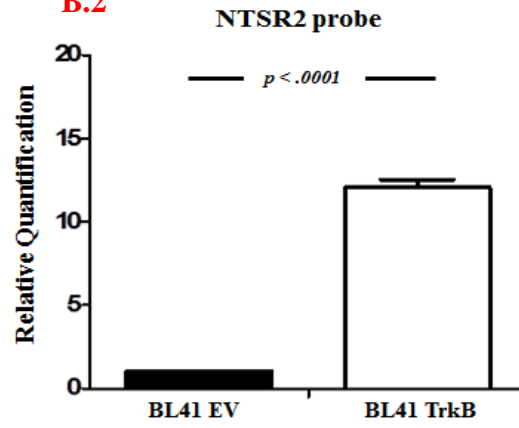
A



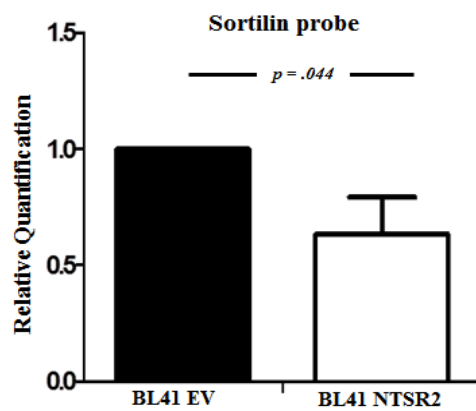
B.1



B.2



C



D

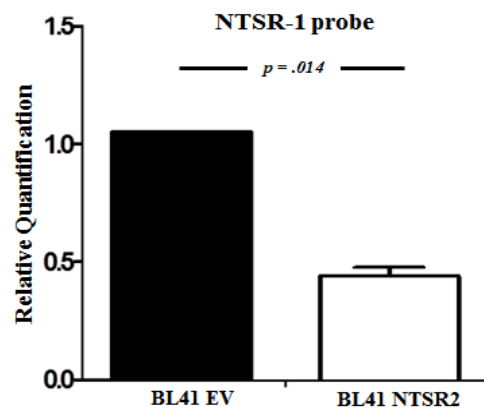
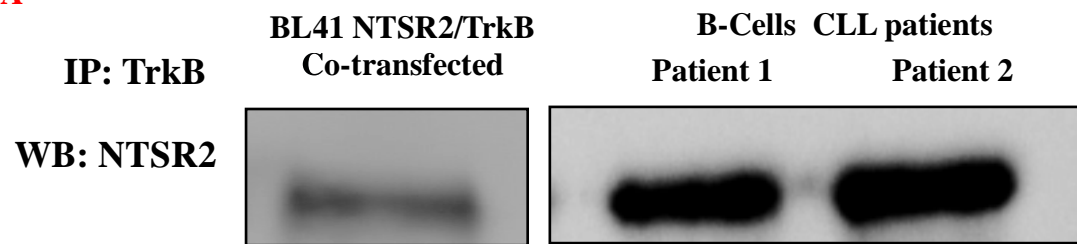
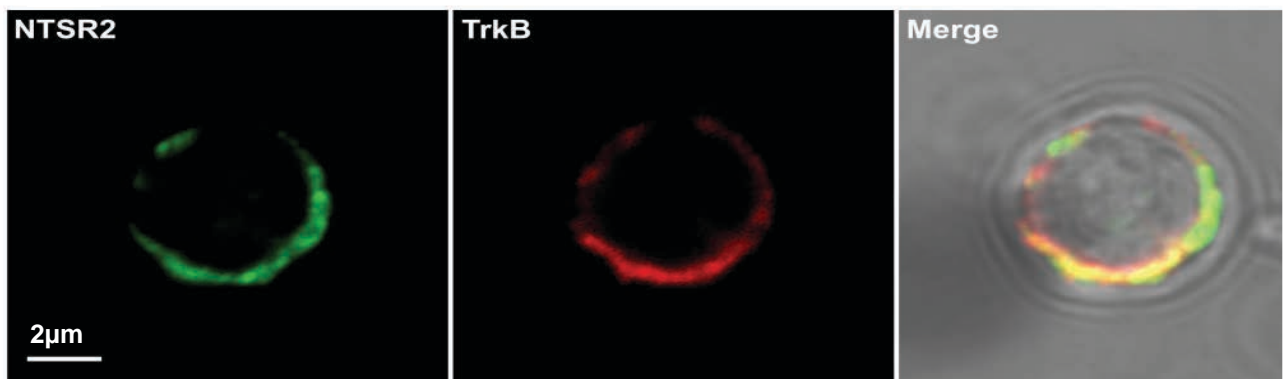


Figure 2 :

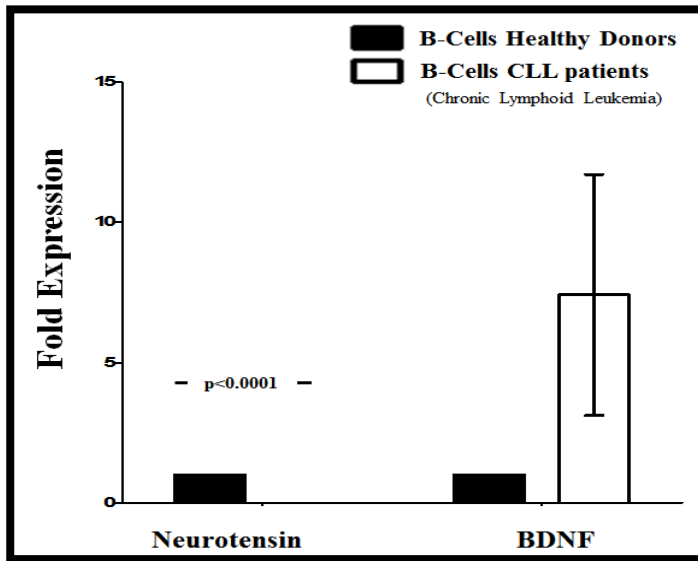
A



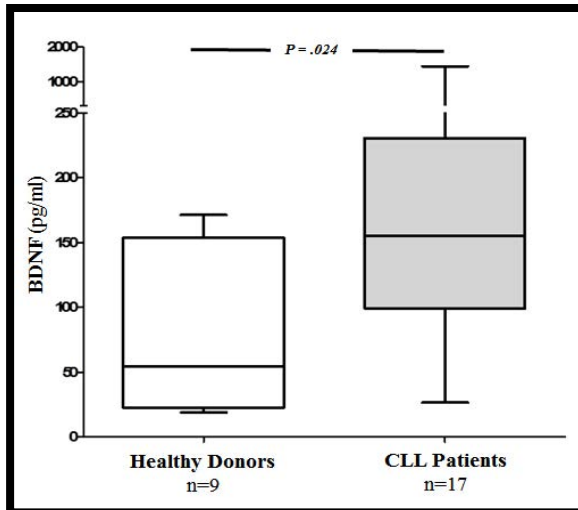
B



C



D



E

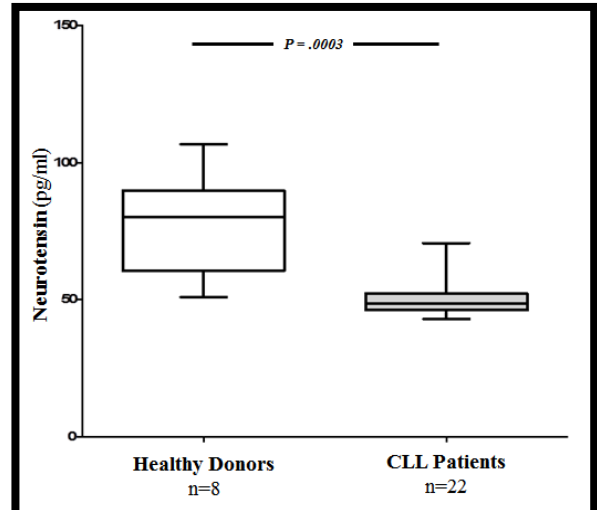
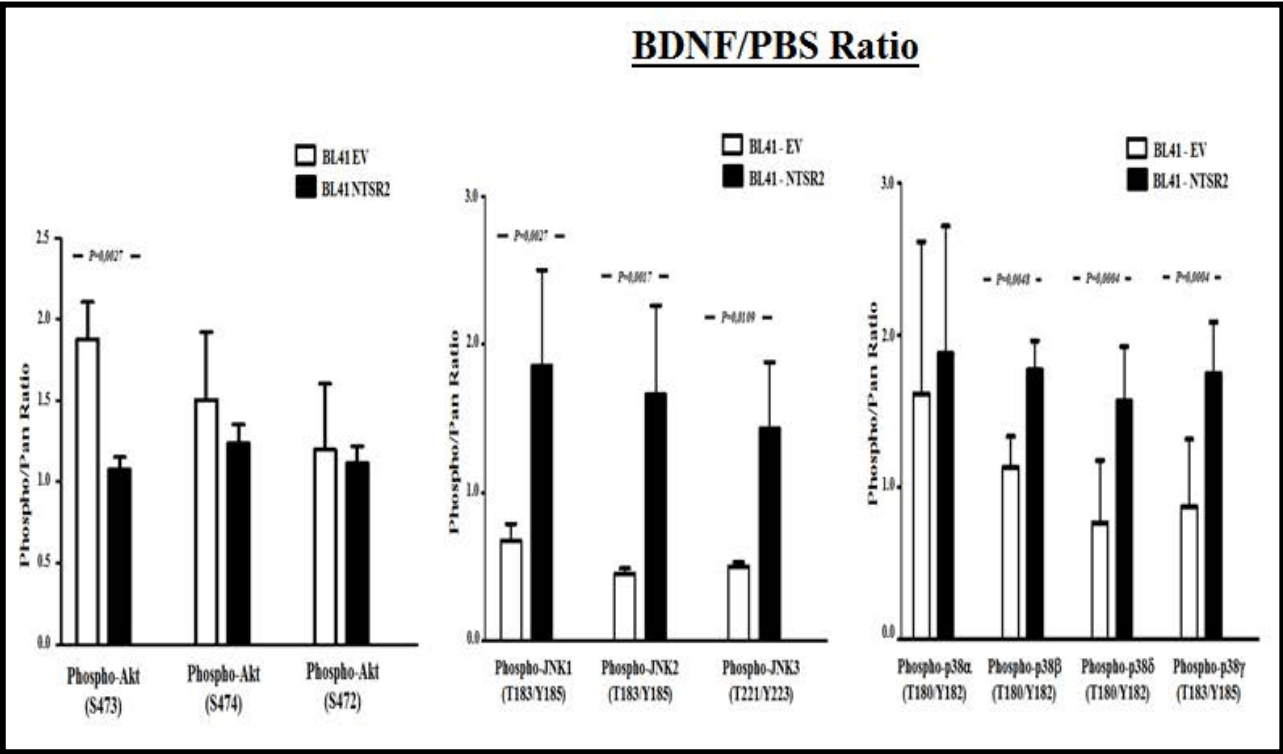
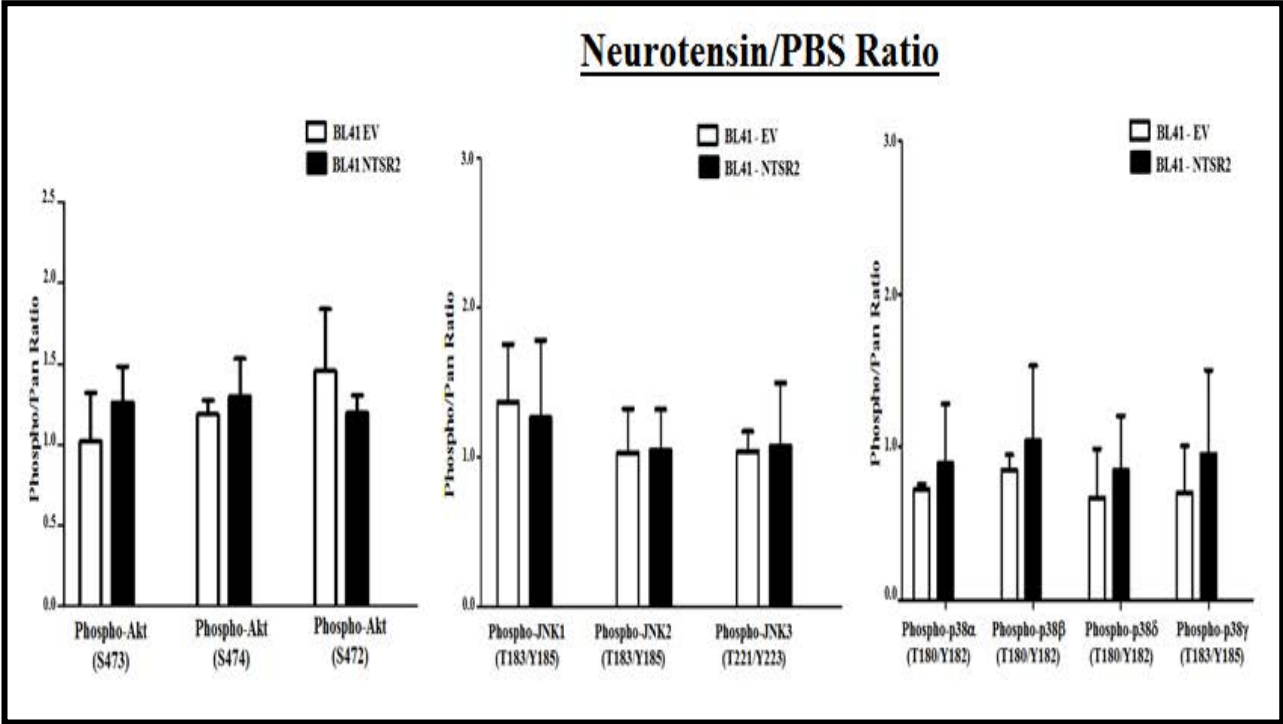


Figure 3 :

A

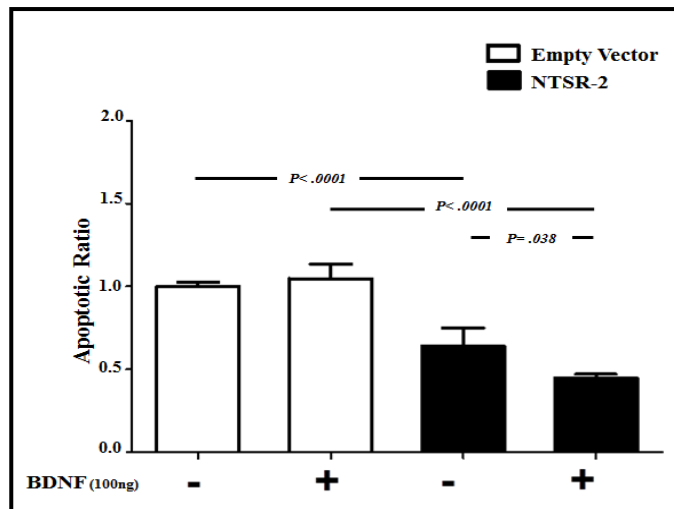


B



C

Transfected BL41 cells cultured in basal conditions (10% FCS)



D

Transfected BL41 cells cultured in stress conditions (0% FCS)

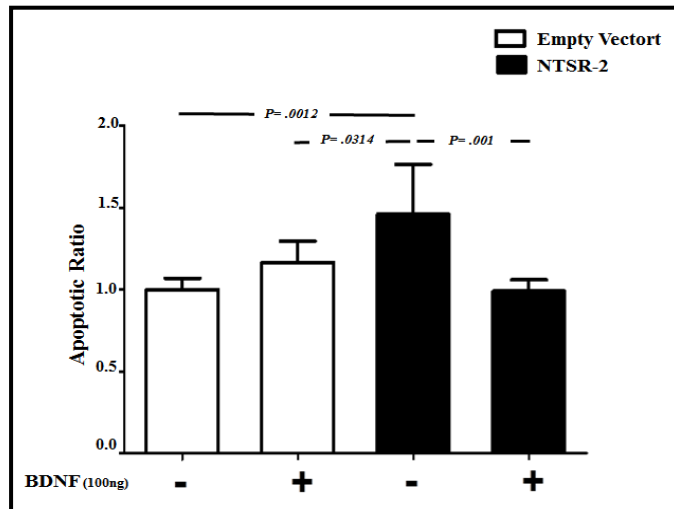


Figure 4 :

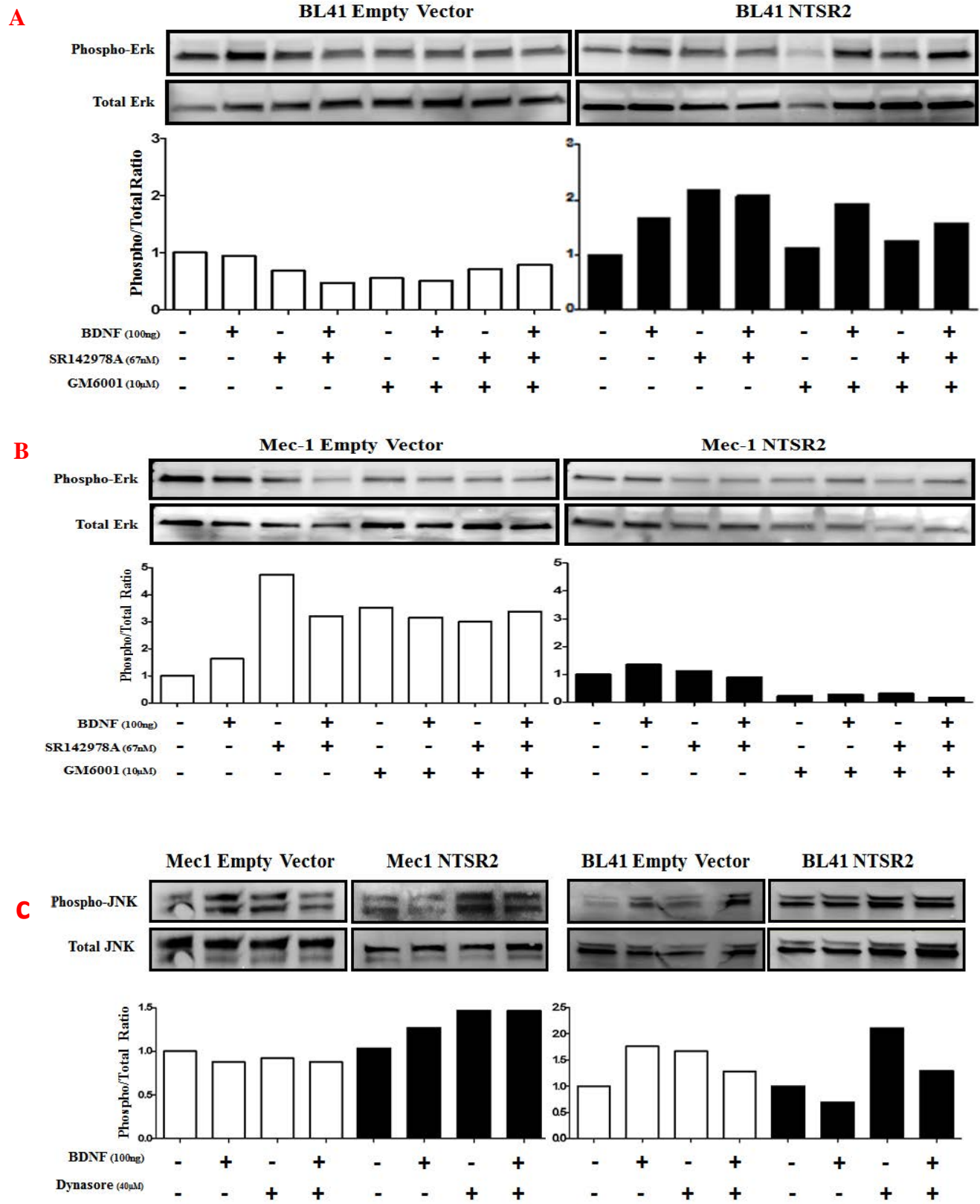


Figure 5 :

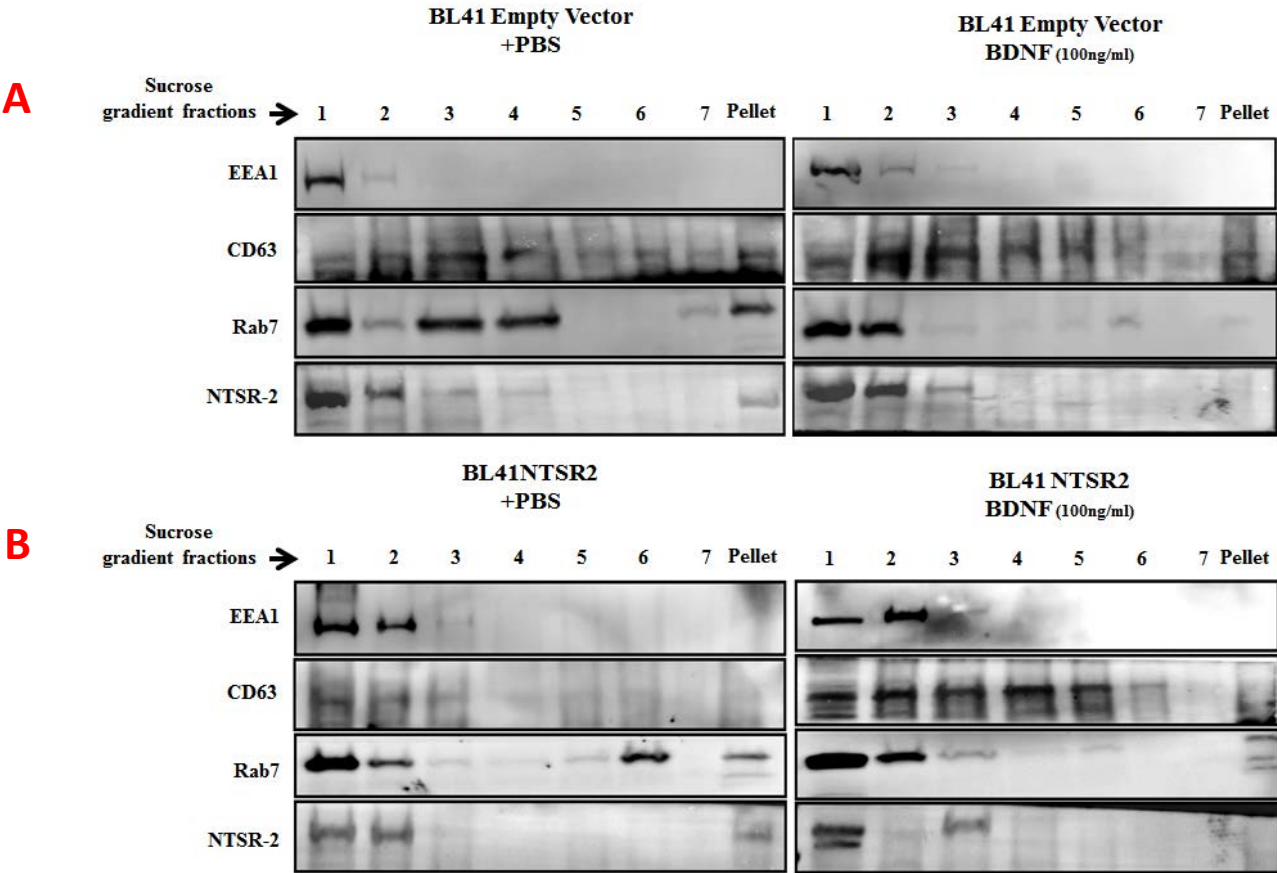
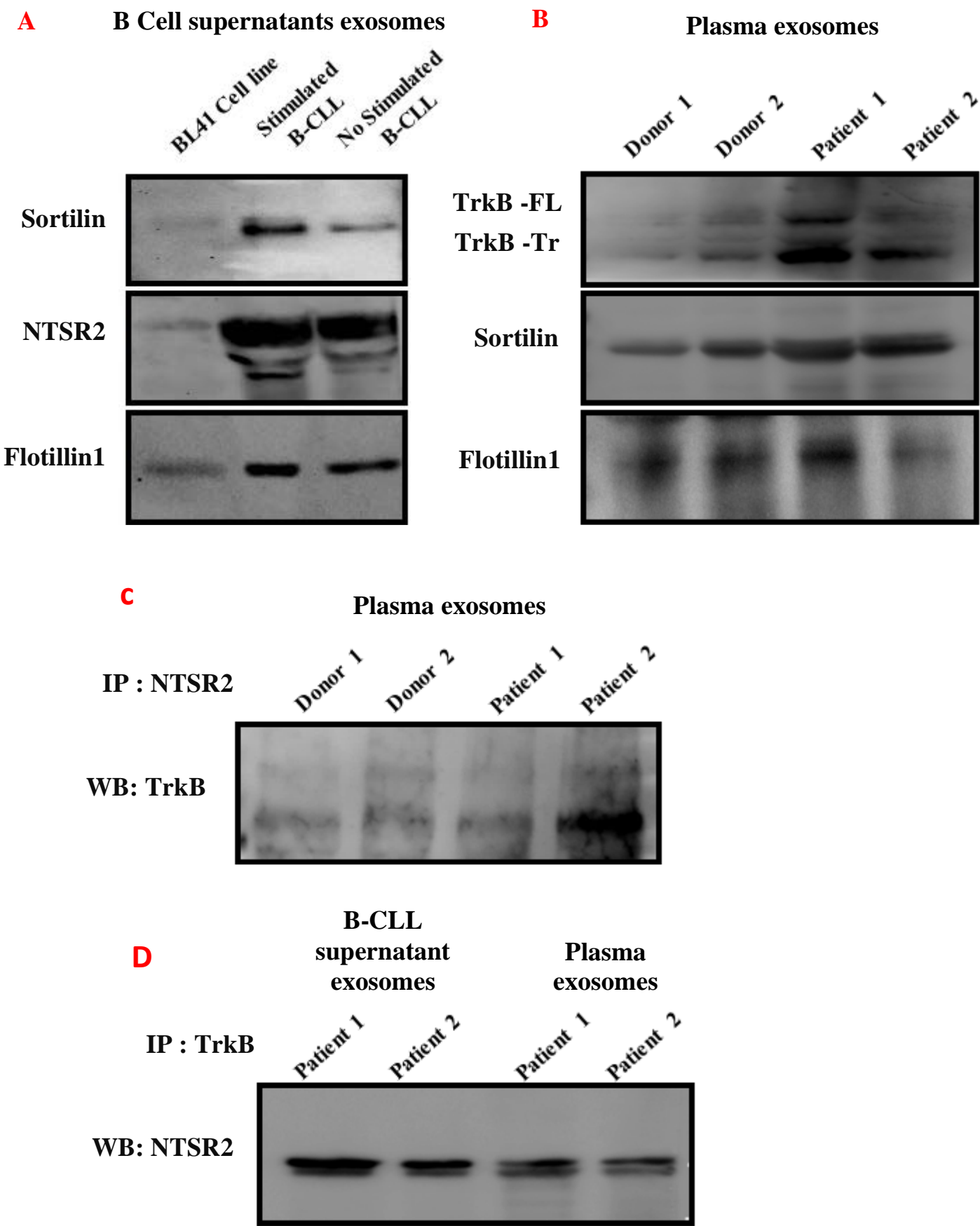


Figure 6 :



Material and methods:

Cell lines and B lymphocytes:

The human mature B cell line (BL41, EBV- Burkitt lymphoma cell line) was kindly provided by Professor J. Feuillard (Limoges, France), and the human chronic B cell line leukemia Mec1, was purchased from Leibniz Institute DSMZ-German collection of microorganisms and cell cultures.

Cells lines were cultured in a humidified 5% CO₂–95% air incubator in 75 cm² flasks (Nunc, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) at 37°C in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Paisley, U.K.), supplemented with 10% FCS and 1% each MEM vitamins, non-essential amino acids, sodium pyruvate, and penicillin-streptomycin (Life Technologies). All cells lines were maintained between 1 to 2x10⁶ cells/ml, and medium was replaced every 3 days. Peripheral normal B cells were cultured in 96 round-bottom plates (Nunc) at 2 to 3x10⁶ cells/mL in 20% FCS-containing RPMI1640 medium supplemented as described above.

Human B lymphocytes from healthy donors and chronic B cell leukemia patient's blood samples from 25 healthy volunteers and 25 patients with chronic B cell leukemia (CLL) were included in this study, after approval of the Institutional Ethic Committee (N°72-2011-18) in accordance with the Declaration of Helsinki. The cells were isolated from 40-mL samples of venous blood obtained using heparinized Vacutainer cells preparation tube (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) by Ficoll-Paque density centrifugation (Eurobio, Courtaboeuf, France). In brief, PBMCs were isolated after centrifugation at 300xg for 30 min. B lymphocytes were then isolated by negative B Cell Isolation Kit II Negative selection kit (MACS; Miltenyi Biotec, Paris, France) according to Manufacturer's protocols. This procedure resulted in 90% CD19+ cells, as determined by flow cytometry analyses using PE cyanine 7–conjugated anti-CD19 Ab (Beckman Coulter, Villepinte, France).

Cell cultures were repeatedly controlled Free of mycoplasma contamination by the DAPI staining method, and EBV negativity was confirmed by PCR (performed by S. Ranger-Rogez, Limoges, France).

Drugs and treatments:

Cultured cells were stressed by 24 hours serum deprivation; incubated with 40 µM exogenous neurotensin (Calbiochem, La Jolla, CA) or 100 ng/ml exogenous human recombinant BDNF (Alomone Labs, Jerusalem, Israel). The optimal concentrations of exogenous BDNF and neurotensin were previously determined [5, 6]. The non-peptide neurotensin receptors antagonist SR142948A (Tocris Biosciences, Bristol, U.K.) was used at 67 nM concentration [57], for 24 hours.

Internalization inhibitor was used targeting clathrin-dependent pathway. Cells were incubated with the dynamin inhibitor, Dynasore (40µM) (Sigma Aldrich) for 2 hours.

Immunocytochemical staining:

After two washes in PBS, the cells were fixed with 4% Paraformaldehyde (Sigma Aldrich) for 10 min, after a PBS wash, cells were permeabilized with PBS-1% BSA-0.1% saponin for 15 min, washed twice

in PBS, and incubated for 1 h in PBS containing 5% goat serum. Cells were then incubated overnight at 4°C with primary antibody (Ab) diluted in PBS-1%BSA. The following Abs were used: rabbit polyclonal anti-NTSR2 (1/200; Alomone Labs, Jerusalem, Israel), and mouse anti-TrkB (1/100; R&D Systems, Lille, France). Cells were washed twice in PBS and incubated with 1 mg/mL Alexa Fluor 488– or 596–conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG Ab (Invitrogen) for 30 min at room temperature. After two washes in PBS, cells were mounted in Mounting Medium containing DAPI (Sigma-Aldrich) and observed using a fluorescence microscope (Leica) and confocal microscopy. Negative controls were performed using cells incubated with irrelevant normal rabbit or goat IgG (Santa Cruz Biotechnology).

NTSR2 and TrkB overexpression:

Human NTSR2 and TrkB DNA on pCMV6-XL4 expression vectors were purchased from OriGene Technologies (OriGene Technologies, Rockville, USA). For transient overexpression of NTSR2 and/or TrkB, cells were transfected by the Amaxa™ Nucleofector™ 2b (Lonza, Verviers Belgium), using an Amaxa Nucleofactor Kit-V according to manufacturer's protocol, with 2µg of pDNA vectors /million cells, and cultured for 48 hours after refreshing the media, in optimal culture conditions followed by 24h of BDNF, neurotensin and drug treatments, PBS or DMSO as negative control treatments.

MVB purification and characterization:

Exosomes were isolated from the B-CLL cells culture and B cell lines cultures supernatants by differential centrifugation as previously described [45], or from 1ml of CLL patients and healthy donors' plasma. Briefly, cells were cultured for the time periods as indicated in figure legends in exosome-free medium and centrifuged at 300 xg for 5 min at 4°C to remove cell debris. Supernatants were further centrifuged at 16,500 xg for 30 min at 4°C. Next, exosomes were pelleted by ultracentrifugation at 110,000 xg for 2 h at 4°C, washed in PBS and centrifuged at 110,000 xg for 2 h at 4°C. For each exosome preparation, the concentration of total proteins was quantified with Bradford method using the commercial Bradford reagent (Sigma Aldrich), after suspending in RIPA buffer and used for protein isolation.

Western Blots:

Proteins were obtained from cell lysates of B cell lines, B-CLL patients or from B cell supernatant cultured in both normal (containing 10% FCS), serum-free medium, and from resting from healthy B cell, for the exosome analyzes, B cell cultured in exosome free-medium or plasma-derived-exosomes. FCS exosomes were depleted by an ultracentrifugation at 120,000 xg for 18 hours at 4°C. After PBS wash, whole cell or exosomes lysates were prepared using RIPA lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, protease inhibitors mixture set III [2 mg/ml; Calbiochem], and a 15-min centrifugation at 14,000 xg.

Equal amounts of proteins from cell lysates (50 µg/lane) were separated on 4 –12% SDS-polyacrylamide gels (Bio-Rad, Hercules, CA) under denaturing conditions and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Molsheim, France). Nonspecific binding sites were blocked for 2 h with 5% nonfat dry milk in TBS. Membranes were incubated with specific Ab overnight at 4°C: rabbit anti-NTSR2 :1/200 (Alomone Labs, Jerusalem Israel); mouse anti-TrkB:1/200, mouse anti-Phospho and mouse anti Pan-Erk :1/500 (R&D Systems), rabbit anti-phospho and rabbit anti-Pan-p38MAPK, rabbit anti-Phospho and rabbit anti-Pan-JNK, rabbit anti-EEA-1, rabbit anti-Rab7: all at 1/500 (Cell Signaling); mouse anti-TrkB (Cell Signaling); mouse anti Flotillin 1; non-specific sites were blocked for 2 h with 5% nonfat dry milk in TBS.

Immunoprecipitation

Cells or exosomes were solubilized in 500 µl of Triton X-100 immunoprecipitation buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 2mM EDTA. Protein A-Sepharose from *Staphylococcus aureus* (50 µl) (10% v/v) was added, and samples were incubated for 1 h at 4 °C. Samples were centrifuged for 15 s, and supernatant was transferred to a fresh 1.5-ml tube. Antibodies were then added (NTSR2: 1/100, TrkB: 1/100) along with protein A-Sepharose (50 µl), and samples were incubated for 16 h at 4°C. Samples were centrifuged for 15 s to pellet protein A-Sepharose, and supernatant was discarded. Pellets were washed three times with immunoprecipitation buffer, and pellets were resuspended in 30 µl of SDS-PAGE sample buffer containing DTT (50 mM) analyzed by SDS-PAGE.

Kinase profiler array:

To investigate the signaling pathways activated with NTSR2 overexpression conditions, the phosphorylated kinases proteome Profiler™ arrays was used (R&D Systems, Wiesbaden, Germany). In brief, transfected cells grown in 24 wells plates and treated by exogenous neurotensin (40µM) or human recombinant BDNF (100 ng/ml) for 24 hours. Approximately, 300µg of total proteins were analyzed for this assay, as recommended by manufacturers. The arrays were scanned and quantified with ImageJ software (NIH, Bethesda, MD). All of the arrays were performed according to the manufacturer's recommendations.

Apoptosis assay:

Basal apoptosis was evaluated by measurement of cytoplasmic soluble nucleosomes determined following the manufacturer's instructions of ELISA Cell Death kit (Roche). Cells were seeded in 96-multiwell plate (5 x 10⁴ cells/well) and cultured for 24h with 100ng/ml rhBDNF or PBS as control. Absorbance values were measured at 405 nm with an ELISA reader (Labsystems). The absorbance obtained for controls was normalized to a value of 1, as previously described [5, 6]. Every experiment was performed in triplicate for at least three times independently.

RNA extraction and reverse transcription:

Total RNA was extracted with Qiagen RNeasy isolation system (Qiagen, Hilden, Germany), treated with RNase-free DNase I (Qiagen), and quantified by NanoDrop (ND-1000) spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) at the absorbance ratio of 260 and 280 nm. The RNA quality was evaluated with Agilent 2100 bioanalyzer using the RNA 6000 Labchip kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). cDNA synthesis was performed with high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), as recommended by the manufacturer. Real-time PCR analyses were performed using the primers and probes, sequences as summarized in **Table-I**. The real-time PCR was performed with cDNA by means of TaqMan probes, labeled with 5'-reporter dye 6-FAM and the 3' Minor Groove Binder-Non-Fluorescent Quencher (MGB-NFQ) (Applied Biosystems). Experiments were performed in triplicates for at least three independent experiments using 400 nM of the forward and reverse primers, 200 nM labeled probe, and 100 ng cDNA template (RNA-cDNA equivalent) per reaction mixed with TaqMan Fast-Univ Master Mix 2X (Applied Biosystems). PCR runs were analyzed by an ABI Step One Plus real-time thermal cycler Detection System (Applied Biosystems) with a two-step PCR protocol (95°C for 20 s followed by 40 cycles of 95°C for 3 s and 60°C for 30 s). The data were normalized to HPRT gene as an internal control (Human HPRT Primer/ Probe Mix; Applied Biosystems). The comparative ΔC_t method was used for relative quantification of gene expression on duplicate of each reaction.

Plasma Neurotensin and BDNF quantification:

Plasma BDNF and Neurotensin levels were measured using commercial ELISA kits according to the manufacturer's instructions BDNF E_{max}[®] ELISA (Promega, Charbonnières, France) and Human Neurotensin (NT) ELISA Kit (Cusabio/Eurobio, Courtaboeuf, France). All assays were performed in triplicate and the data are presented as pg/mL.

Sucrose Gradient Analysis:

Cells were incubated for 2 hours with 100 ng/ml of BDNF. After washing in PBS, cells were solubilized in 0.5 ml gradient buffer for 10 min at 4 °C (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.5% (v/v) non-ionic detergent Triton X100, 2.5% (w/v) sucrose and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). Nuclei were pelleted by centrifugation at 1000×g for 15 min, the supernatant (0.5 ml) was layered onto a 6.5 ml of 5–25% (w/v) sucrose gradient (in gradient buffer), and components were resolved by centrifugation at 40,000 × g for 18 h at 4 °C. After centrifugation, 7 gradient fractions of 1 ml were removed carefully from the gradient and the pellet was solubilized in gradient buffer. Harvested samples were precipitated by 20% TCA (Trichloroacetic acid) (v/v) and 20% cold Acetone (v/v). After 3 washes in cold Acetone, precipitates were solubilized in 4X SDS lysis buffer (Tris pH 6.8, 20% SDS, 10% Glycerol, 2% 2-Mercaptoethanol) and analyzed by immunoblotting.

Data treatments and Statistical analysis:

Relative MAP-kinases arrays and Western blot band intensities were compared and quantified using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD). Results were analyzed for statistical significance by one-way ANOVA or Mann-Whitney tests, using Statview software (Statview v.5.0). Data shown are representative of at least three independent experiments.

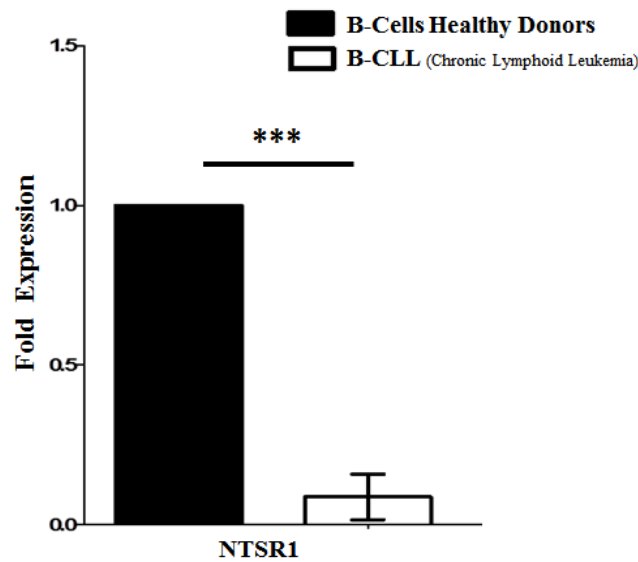
Table I: Forward, reverse primers and TaqMan probes used in qRT-PCR analysis:

Names		Sequences
BDNF	Forward	GGCTATGTGGAGTTGGCATT
	Reverse	CAAAACGAAGGCCTCTGAAG
	Probe	ATTTCTGAGTGGCCATCCCAAGGTCTAG
TrkB	Forward	CTGGTGAAAATCGGGGACT
	Reverse	AGGAAATTCACGACGGAAAG
	Probe	TGTACAGCACTGACTACTACAGGGTCGGTG
P75 ^{NTR} /NGFR	Forward	CACCACCGACAACCTCATC
	Reverse	AAGCAGAACAAGCAAGGAGC
	Probe	CCTACATAGCCTTCAAGAGGTGGAACAGCT
Sortilin/NTSR3	Forward	AGCCAGTGGGTCTCCTACAC
	Reverse	CACTCCACAGACCCTGAAGA
	Probe	TCCTTGAAAGGAACTGTGAAGAGAAGGACT
NTSR2	Forward	ATCCAGGTGAATGTGCTGGT
	Reverse	CCAAGTGCCGTCCACTTCTA
	Probe	ACTAACTGCTTTCCTGAATGGGGTCACAGT
Neurotensin	Forward	TGACCAATATGCATACATCAAAGA
	Reverse	TAATTTGAACAGCCCAGCTG
	Probe	CATGTTCCCTCTTGGAAGATGACTCTGCTA

Supplementary data :

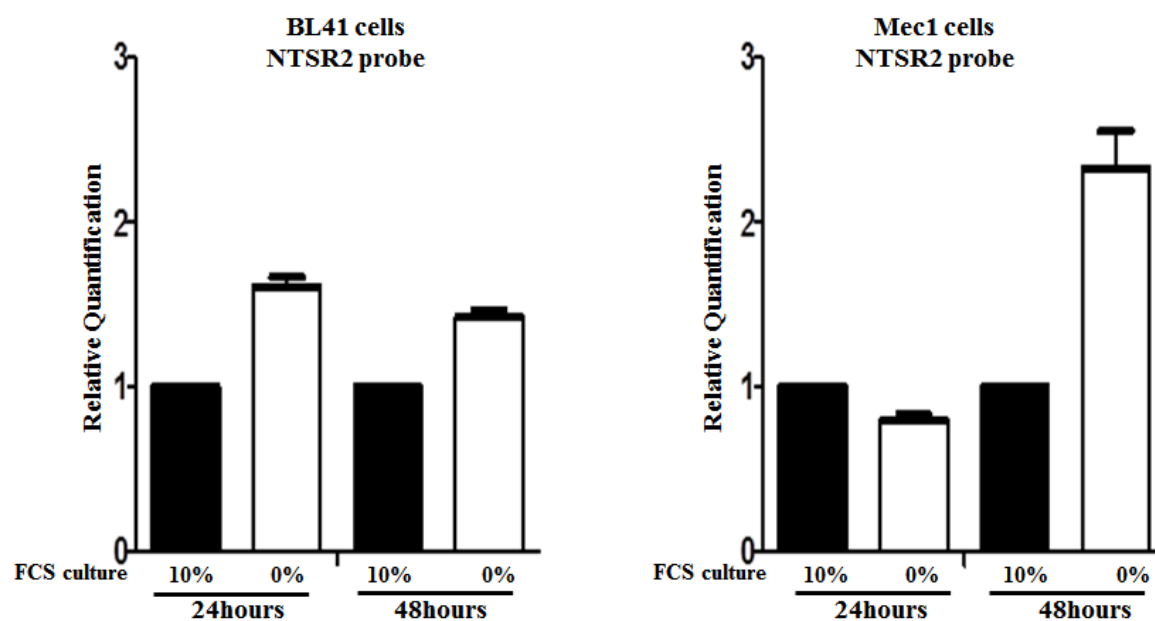
Sup. Figure 1 : NTSR1 expression levels on B cells from CLL patients vs healthy B cells:

qRT-PCR analysis of neurotensin receptor1 (NTSR1), in resting healthy B cells (n = 5, black histogram) and chronic B cell leukemia (B-CLL) (n = 5 white histogram). Data are expressed as means of Fold Expression (relative quantities or RQs) values +/- SEM normalized to an arbitrary value of 1 (***, $p < 0.001$).



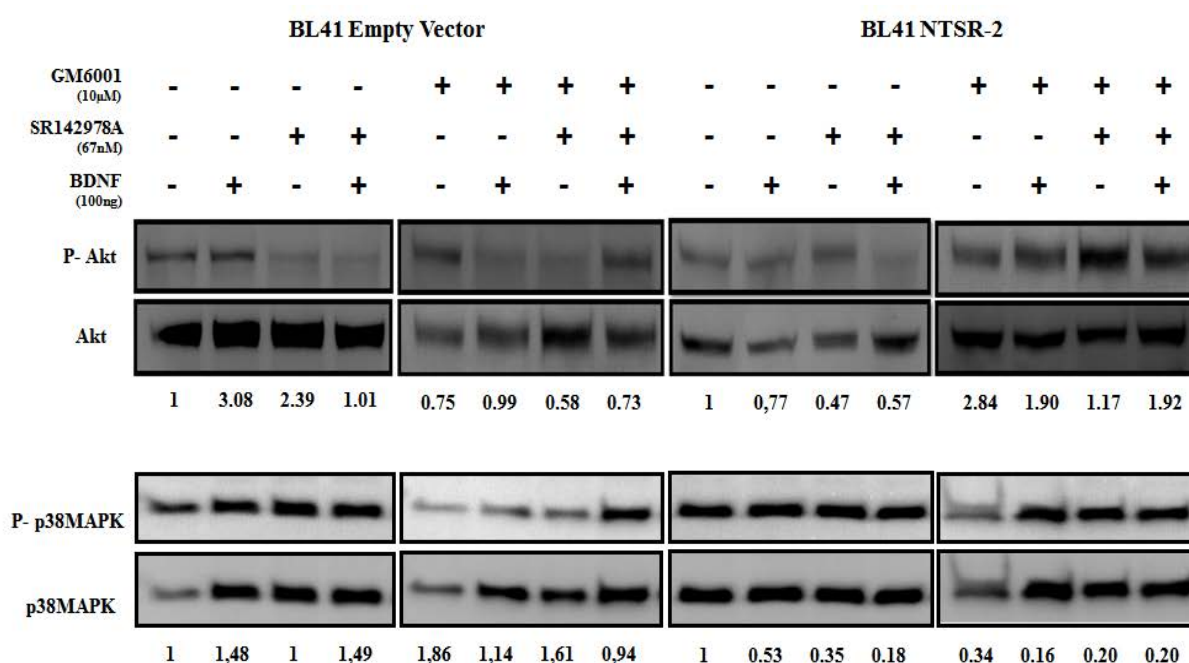
Sup. Figure 2: NTSR2 transcript levels BL41 and Mec1 cell lines after 24 and 48 hours of basal culture condition (10%FCS) in comparison with stress culture condition (0% FCS) :

qRT-PCR analysis of neurotensin receptor 2 (NTSR2), basal culture condition (black histograms) and in starvation condition (white histograms). Data are expressed as means of Fold Expression (relative quantities or RQs) values \pm SEM normalized to an arbitrary value of 1.



Sup. Figure 3: Signaling pathway analysis after NTSRs antagonist and metalloprotease inhibitor

BDNF (100ng/ml, 24 hours) effects on Akt and p38MAPK activation signaling pathways in BL41 cells overexpressing NTSR2 in comparison with Empty vector transfected cells, after NTSRs inhibition with SR142978A (67nM), pretreated or not with metalloprotease inhibitor GM6001 (10μM) (DMSO, negative control). Values represent a phosphorylation state Ratio of Akt and p38MAPKinase of each condition of treatment, compared to the phosphorylation states Ration of non-treated cells, normalized to an arbitrary value of 1.



1. Shi, J., *Regulatory networks between neurotrophins and miRNAs in brain diseases and cancers*. Acta Pharmacol Sin, 2015. **36**(2): p. 149-157.
2. Devader, C., et al., *The anti-apoptotic role of neurotensin*. Cells, 2013. **2**(1): p. 124-35.
3. Torcia, M., et al., *Nerve growth factor inhibits apoptosis in memory B lymphocytes via inactivation of p38 MAPK, prevention of Bcl-2 phosphorylation, and cytochrome c release*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 39027-36.
4. Pearce, R.N., et al., *A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4429-36.
5. Fauchais, A.L., et al., *Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3027-38.
6. Saada, S., et al., *Differential expression of neurotensin and specific receptors, NTSR1 and NTSR2, in normal and malignant human B lymphocytes*. J Immunol, 2012. **189**(11): p. 5293-303.
7. Swift, S.L., J.E. Burns, and N.J. Maitland, *Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer*. Cancer Res, 2010. **70**(1): p. 347-56.
8. Haase, C., et al., *Neurotensin receptors in adeno- and squamous cell carcinoma*. Anticancer Res, 2006. **26**(5A): p. 3527-33.
9. Stacchini, A., et al., *MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation*. Leuk Res, 1999. **23**(2): p. 127-36.
10. Gilmour, A.M., et al., *A novel epidermal growth factor receptor-signaling platform and its targeted translation in pancreatic cancer*. Cell Signal, 2013. **25**(12): p. 2587-603.
11. Abdulkhalek, S., et al., *Neu1 sialidase and matrix metalloproteinase-9 cross-talk is essential for Toll-like receptor activation and cellular signaling*. J Biol Chem, 2011. **286**(42): p. 36532-49.
12. Roelle, S., et al., *Matrix metalloproteinases 2 and 9 mediate epidermal growth factor receptor transactivation by gonadotropin-releasing hormone*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 47307-18.
13. Macia, E., et al., *Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin*. Dev Cell, 2006. **10**(6): p. 839-50.
14. Ushio-Fukai, M., *Vascular signaling through G protein-coupled receptors: new concepts*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2009. **18**(2): p. 153-9.
15. Pyne, N.J. and S. Pyne, *Receptor tyrosine kinase-G-protein-coupled receptor signalling platforms: out of the shadow?* Trends Pharmacol Sci, 2011. **32**(8): p. 443-50.
16. Waters, C.M., et al., *c-Src is involved in regulating signal transmission from PDGFbeta receptor-GPCR(s) complexes in mammalian cells*. Cell Signal, 2005. **17**(2): p. 263-77.
17. Luttrell, D.K. and L.M. Luttrell, *Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases*. Oncogene, 2004. **23**(48): p. 7969-78.
18. Cunha, F.M., et al., *Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling*. J Biol Chem, 2008. **283**(36): p. 24448-59.
19. Zhang, J., et al., *A central role for beta-arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in beta2-adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types*. J Biol Chem, 1997. **272**(43): p. 27005-14.

20. May, V., et al., *PACAP-induced ERK activation in HEK cells expressing PAC1 receptors involves both receptor internalization and PKC signaling*. Am J Physiol Cell Physiol, 2014. **306**(11): p. C1068-79.
21. Canuel, M., et al., *AP-1 and retromer play opposite roles in the trafficking of sortilin between the Golgi apparatus and the lysosomes*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **366**(3): p. 724-30.
22. Petersen, C.M., et al., *Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3599-605.
23. Canuel, M., Y. Libin, and C.R. Morales, *The interactomics of sortilin: an ancient lysosomal receptor evolving new functions*. Histol Histopathol, 2009. **24**(4): p. 481-92.
24. Lemansky, P., et al., *The cation-independent mannose 6-phosphate receptor is involved in lysosomal delivery of serglycin*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(4): p. 1149-58.
25. Wahe, A., et al., *Golgi-to-phagosome transport of acid sphingomyelinase and prosaposin is mediated by sortilin*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 14): p. 2502-11.
26. Johnstone, R.M., et al., *Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)*. J Biol Chem, 1987. **262**(19): p. 9412-20.
27. Raposo, G., et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1161-72.
28. da Silva, L., et al., *Neurotensin downregulates the pro-inflammatory properties of skin dendritic cells and increases epidermal growth factor expression*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(10): p. 1863-71.
29. Schenone, A., et al., *Expression of high- and low-affinity neurotrophin receptors on human transformed B lymphocytes*. J Neuroimmunol, 1996. **64**(2): p. 141-9.
30. Teng, H.K., et al., *ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin*. J Neurosci, 2005. **25**(22): p. 5455-63.
31. Hempstead, B.L., *The many faces of p75NTR*. Curr Opin Neurobiol, 2002. **12**(3): p. 260-7.
32. Mazella, J., et al., *The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor*. J Biol Chem, 1998. **273**(41): p. 26273-6.
33. Wu, Z., et al., *Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy*. Front Endocrinol (Lausanne), 2012. **3**: p. 184.
34. Dupouy, S., et al., *The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers*. Biochimie, 2011. **93**(9): p. 1369-78.
35. Beraud-Dufour, S., et al., *Neurotensin receptor-2 and -3 are crucial for the anti-apoptotic effect of neurotensin on pancreatic beta-TC3 cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(12): p. 2398-402.
36. Cattaneo, F., et al., *Cell-surface receptors transactivation mediated by G protein-coupled receptors*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(11): p. 19700-28.
37. El-Shewy, H.M., et al., *Insulin-like growth factors mediate heterotrimeric G protein-dependent ERK1/2 activation by transactivating sphingosine 1-phosphate receptors*. J Biol Chem, 2006. **281**(42): p. 31399-407.

38. Delcourt, N., J. Bockaert, and P. Marin, *GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation*. Trends Pharmacol Sci, 2007. **28**(12): p. 602-7.
39. Mira, E., et al., *A role for chemokine receptor transactivation in growth factor signaling*. EMBO Rep, 2001. **2**(2): p. 151-6.
40. Hobson, J.P., et al., *Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility*. Science, 2001. **291**(5509): p. 1800-3.
41. Rose, C.R., et al., *Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells*. Nature, 2003. **426**(6962): p. 74-8.
42. Moughal, N.A., et al., *Nerve growth factor signaling involves interaction between the Trk A receptor and lysophosphatidate receptor 1 systems: nuclear translocation of the lysophosphatidate receptor 1 and Trk A receptors in pheochromocytoma 12 cells*. Cell Signal, 2004. **16**(1): p. 127-36.
43. Moughal, N.A., et al., *Protean agonism of the lysophosphatidic acid receptor-1 with Ki16425 reduces nerve growth factor-induced neurite outgrowth in pheochromocytoma 12 cells*. J Neurochem, 2006. **98**(6): p. 1920-9.
44. Chen, Z.Y., et al., *Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway*. J Neurosci, 2005. **25**(26): p. 6156-66.
45. Wilson, C.M., et al., *Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 18): p. 3983-97.
46. Gendron, L., et al., *Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling: internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2*. Mol Pharmacol, 2004. **66**(6): p. 1421-30.
47. Zhang, J., et al., *Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization*. J Biol Chem, 1996. **271**(31): p. 18302-5.
48. Daub, H., et al., *Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor*. EMBO J, 1997. **16**(23): p. 7032-44.
49. Katzmann, D.J., M. Babst, and S.D. Emr, *Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I*. Cell, 2001. **106**(2): p. 145-55.
50. Marchese, A. and J.L. Benovic, *Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 45509-12.
51. Hislop, J.N. and M. von Zastrow, *Role of ubiquitination in endocytic trafficking of G-protein-coupled receptors*. Traffic, 2011. **12**(2): p. 137-48.
52. Hanson, P.I. and A. Cashikar, *Multivesicular body morphogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2012. **28**: p. 337-62.
53. Henne, W.M., N.J. Buchkovich, and S.D. Emr, *The ESCRT pathway*. Dev Cell, 2011. **21**(1): p. 77-91.
54. Bucci, C., et al., *Rab7: a key to lysosome biogenesis*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(2): p. 467-80.
55. Vitelli, R., et al., *Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway*. J Biol Chem, 1997. **272**(7): p. 4391-7.
56. Muntasell, A., A.C. Berger, and P.A. Roche, *T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes*. EMBO J, 2007. **26**(19): p. 4263-72.

57. Vita, N., et al., *Neurotensin is an antagonist of the human neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells*. Eur J Pharmacol, 1998. **360**(2-3): p. 265-72.

Discussion

Les travaux réalisés au sein de notre groupe ont précédemment caractérisé la fonction des neurotrophines comme facteurs de croissance sécrétés par les lymphocytes B au cours de stress cellulaire, responsables ainsi d'une boucle autocrine de survie [11, 200, 603]. L'implication des neurotrophines dans l'homéostasie des cellules lymphocytaire B a ainsi été démontrée [11, 200] et dépend également d'une protéine à domaine Vps-10 (*Vacuolar protein sorting-10*) la sortiline [11, 603]. En effet, la sortiline peut lier les pro-neurotrophines comme les neurotrophines matures [53, 153] et participer à la régulation de la balance survie/mort cellulaire [9, 154-156]. En effet, sa capacité de liaison au récepteur à domaine de mort p75^{NTR} lui confère une fonction de co-récepteur. Le complexe sortiline/p75^{NTR} peut ainsi fixer les pro-neurotrophines et activer le domaine de mort situé dans la partie intracellulaire du p75^{NTR} et induire l'apoptose [9, 154-156]. La sortiline est ainsi impliquée dans l'apoptose des cellules lymphocytaires B, induite notamment par le pro-BDNF [11].

La sortiline possède également un site de fixation à un autre neuropeptide, la neurotensine dont elle constitue un des récepteurs, nommé NTSR3 (*Neurotensin Receptor-3*) [367]. Elle peut ainsi induire l'activation d'une signalisation intracellulaire de survie par sa liaison à la NTS [503, 538]. Néanmoins, ces fonctions n'ayant pas été décrites dans les lymphocytes B, nous avons émis l'hypothèse que les lymphocytes B humains exprimant la sortiline pouvaient également être régulés par une sécrétion endogène de NTS, de façon synergique à celle des neurotrophines.

Les résultats obtenus au niveau transcriptionnel (qRT-PCRs) et protéiques (Westerns blot, immunofluorescence et de cytométrie en flux) ont montré pour la première fois que la NTS ainsi que ses deux autres récepteurs, NTSR1 et NTSR2, étaient exprimés dans les lymphocytes B humains normaux ainsi que dans des lignées lymphocytaires B correspondant aux différents stades du développement lymphocytaire (pro-B, pré-B, B matures ainsi que plasmocytes). NTSR1 et NTSR2 sont des récepteurs couplés aux protéines-G (RCPG), respectivement de haute et de faible affinité pour la NTS. Nos résultats ont montré que l'induction de mort cellulaire par stress pro-apoptotique (privation sérique et/ou une activation du récepteur Fas) est inhibée par l'addition de NTS exogène. La NTS augmente également la prolifération lymphocytaire B. De façon intéressante, les effets prolifératifs et anti-

apoptotiques de la NTS, augmentés en situation de stress cellulaire, sont peu significatifs en conditions basales de cultures (10% de SVF). Ces observations sont corrélées à l'état d'activation des récepteurs de la NTS. En effet, les récepteurs NTSR1 ainsi que la sortiline (NTSR3) sont relocalisés à la membrane plasmique en condition de stress cellulaire. De plus, la masse moléculaire (Mr) de NTSR1, évaluée en western blot, est légèrement augmentée en condition de stress cellulaire (56 kDa) par rapport à celle des conditions basales de culture, et est similaire à celle retrouvée dans les cellules de carcinome colorectal (lignées cellulaires HT29) en condition de stress sérique. Ces différences pourraient correspondre à des modifications post traductionnelles comme cela a été précédemment démontré lors de l'activation de NTSR1 qui est alors glycosylé [381], l'activation des protéines-G et la signalisation intracellulaire qui en découle étant inhibées par un inhibiteur de la N-glycosylation, la tunicamycine.

Les effets anti-apoptotiques de la NTS sont également inhibés par un antagoniste chimique du récepteur NTSR1, le SR48692 ou Meclinetant®. Nous avons ainsi démontré le rôle prolifératif et anti-apoptotique de l'axe neurotensine/NTSR1 dans les lignées lymphocytaires B. Cette voie d'activation a été préalablement démontrée dans plusieurs cancers solides [431, 562-564]. La surexpression du récepteur NTSR1 a été associée dans plusieurs études à la croissance et à la prolifération des cellules tumorales [392, 395, 427, 431, 463, 569, 577, 578, 586, 587]. Il a également été démontré que la NTS induisait une augmentation des voies de signalisation cellulaire de survie et de prolifération [392, 582-585]. L'axe NTS /NTSR1 active ainsi des voies de survie autocrines des cellules tumorales de cancers solides, notamment d'adénocarcinomes mammaires, pulmonaires, pancréatiques et coliques [392, 564, 581, 588, 613, 615, 722].

Au niveau lymphocytaire, des travaux précédents ont montré que des lignées lymphocytaires T (Molt-4 et Jurkat) fixaient la NTS [517] et que celle-ci était impliquée dans l'inhibition de la migration induite par l'IL-2 de lymphocytes T malins, isolés de lymphome T cutané [519, 520]. Nos travaux nous permettent de mettre en évidence que la NTS et ses récepteurs sont également impliqués dans des lymphoproliférations B. L'analyse de l'expression de la NTS et de ses récepteurs NTSR1 et NTSR2 dans des tissus de patients atteints d'hémopathies B malignes a été confirmée dans les ganglions infiltrés par un lymphome diffus à grandes cellules-

B (DLBCL). Néanmoins, elle est également détectée dans des ganglions tumoraux de patients ayant un adénocarcinome colique métastatique ainsi que dans des ganglions non tumoraux mais inflammatoires (patients ayant une sarcoïdose). La NTS, NTSR1 et NTSR2 sont aussi détectés dans les lymphocytes B circulants de donneurs sains.

Si l'expression de la NTS et de ces 2 RCPG est mise en évidence au cours du lymphome B, en revanche, une modification de l'expression de ces 2 récepteurs a été observée chez les patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC). En effet, au niveau transcriptionnel, ces lymphocytes B de LLC sont dépourvus de NTS et sous expriment NTSR1 à l'inverse de ceux de sujets sains. Par ailleurs, une augmentation significativement importante de l'expression du récepteur NTSR2 a été détectée dans les cellules B des patients atteints de LLC. Un tel niveau d'expression n'a pas été observé dans les ganglions infiltrés par un DLBCL ou un cancer colique.

La confrontation de ces résultats aux données de la littérature révèle que très peu d'études ont décrit l'expression ou la fonction du récepteur NTSR2 au niveau de cellules malignes. En oncologie, la plupart des travaux se sont focalisés sur l'implication de l'axe NTS /NTSR1 et ont permis de décrypter la signalisation cellulaire induite par l'activation du récepteur NTSR1 [460, 578, 599, 613]. La surexpression du récepteur NTSR2 par des cellules cancéreuses a été démontrée dans un modèle de cancer de la prostate [578]. Ce récepteur est surexprimé dans des lignées issues de cancers prostatiques différenciés par rapport à des lignées non différenciées dépourvues de récepteurs androgéniques ou à des cellules d'adénomes [578].

L'expression de NTSR2 en cancérologie a également été décrite au niveau de xénogreffes de lignées cellulaires de cancer colique (HT29) et de carcinome épidermoïde (Fadu), sans qu'aucune association entre le développement, la croissance tumorale et le récepteur NTSR2 ne soit démontrée [599]. Par ailleurs, les modèles d'expression de ce récepteur obtenus par transfection dans des lignées cellulaires (COS-7) ont montré que NTSR2 pouvait s'associer avec le récepteur NTSR1, modulant la localisation de NTSR1 au niveau cellulaire, et ainsi son activation. En effet, NTSR1 est localisé à la membrane plasmique, alors que sa co-expression avec NTSR2 le rend principalement intracellulaire [600]; ces données

suggèrent que NTSR2 induit une séquestration intracellulaire de NTSR1, lui conférant une fonction de régulateur de NTSR1 et de sa signalisation [600, 601].

La surexpression de NTSR2 dans les cellules B de LLC nous a conduit à surexprimer ce récepteur dans 2 lignées B matures (BL41 et MEC1 transfectées par le vecteur d'expression de NTSR-2 humain) afin d'étudier le rôle oncogénique potentiel de ce récepteur. Cette surexpression de NTSR2 s'accompagne d'une augmentation de l'expression du récepteur TrkB. Nous avons parallèlement observé une diminution de l'expression de la NTS, de NTSR1 et de la sortiline, similaire à celles détectées des lymphocytes B issus de LLC, suggérant que leurs expressions pourraient être régulées par celle de NTSR2.

Compte tenu de la surexpression transcriptionnelle mutuelle des récepteurs TrkB et NTSR2 dans les lignées B transfectées et du maintien de l'expression de TrkB dans les cellules B de patients LLC par rapport aux cellules B normales, nous avons émis l'hypothèse qu'une régulation commune pouvait intervenir entre les deux récepteurs NTSR2 et TrkB. Les analyses ont montré que ces deux récepteurs étaient co-exprimés, co-immunopurifiés et co-localisés dans les cellules B de patients, mais également dans les lignées B surexprimant NTSR2. Une telle colocalisation n'a pas été préalablement décrite que ce soit dans des tissus normaux ou néoplasiques.

L'interaction entre des récepteurs à domaine Tyrosine Kinase ou RTK, avec un RCPG a déjà été décrite [607]. L'interaction entre ces deux types de récepteurs forme une plateforme de signalisation cellulaire en présence de l'un des ligands des deux récepteurs et induit une transactivation du second récepteur [607-610, 723-725], notamment dans le domaine de la cancérologie avec le récepteur à l'EGF dans les cancers du pancréas [726, 727], du rein [728], du colon [729], du poumon [730, 731] et de la prostate [589, 732]. En effet, l'activation des récepteurs à la NTS, notamment NTSR-1, induit l'activation de récepteurs à Tyrosine Kinase, dans le cancer de prostate [589], et plus récemment dans le cancer du sein [616] et dans le cancer bronchique [595].

La transactivation des récepteurs Trk aux neurotrophines, particulièrement celle de TrkB a été également rapporté, ce dernier pouvant être transactivé par la liaison de la sérotonine (5-HT) sur son récepteur couplé aux protéines-G dans un modèle neuronal [733]. La transactivation de TrkB est dépendante de la production d'espèces réactives de l'oxygène dans ce modèle [733].

La transactivation des récepteurs tyrosine kinases peut également être induite par l'activation de métalloprotéases *via* l'activation d'un complexe protéique et la production des espèces réactives de l'oxygène qui vont directement phosphoryler le domaine Tyrosine Kinase des RTK et enclencher sa cascade de signalisation [607-610, 723-725]. Cette transactivation peut également être indépendante de médiateurs intracellulaires pour la transactivation du récepteur RTK par le récepteur RCPG, la transactivation découlant d'une interaction entre les deux récepteurs. Le récepteur aux neurotrophines TrkA peut ainsi être transactivé par le RCPG, LPA(1)R (*Lysophosphatidate receptor-1*) [630], tout comme le récepteur au VEGF, le VEGFR-2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2*) par le RCPG, S1P (*Sphingosine 1-phosphate*) [734]. Ces deux couples de récepteurs (TrkA/LPA, VEGFR2/S1P) forment chacun un complexe de signalisation pouvant transduire un signal intracellulaire et activer les voies PKC et ERK [630, 734].

La formation d'un complexe RTK/RCPG induit une plateforme de signalisation pouvant être activée par plusieurs ligands, en l'occurrence les ligands du RTK ou celui du RCPG. C'est ce qui est suggéré notamment au niveau du complexe RTK/RCPG, VEGFR-2/S1P, l'inhibition de l'un ou l'autre des acteurs de ce complexe bloquant la signalisation induite quel que soit le ligand activateur [734]. C'est également le cas du complexe TrkA/LPA-Receptor [630, 631]. L'importance mécanistique de la formation d'une plateforme de signalisation par un couple RTK/RCPG induite par le ligand du RTK a été démontrée pour l'induction de la mobilité et la migration cellulaire [735, 736], l'extension des neurites [737], l'inflammation et la tumorigénèse [738], ainsi que pour des fonctions anti-apoptotiques [739]. L'ensemble de ces mécanismes physiologiques et/ou physiopathologiques impliquent l'activation de la signalisation des MAPK et des ERK [725, 740].

Dans notre étude, l'interaction TrkB/NTSR-2 peut promouvoir une signalisation dépendante du ligand du TrkB, le BDNF. Ces données sont confortées par la co-localisation des 2 récepteurs et peuvent rejoindre les observations faites par Rose et ses collaborateurs, concernant l'activation de TrkB tronqué par le BDNF dans une signalisation passant par des RCPG non identifiés [93].

Toutefois, l'activation du complexe de récepteurs RTK/RCPG conduit au recrutement et à l'activation du proto-oncogène c-Src, qui est régulée par la sous-

unités β , γ et α la protéine-G, cette dernière recrute à son tour, des protéines comme la β -Arrestin et la dynamine permettant l'endocytose du complexe de récepteurs RTK/RCPG [607, 626-629]. En effet, le blocage de la fonction des dynamines empêche l'internalisation du récepteur RCPG, et donc du complexe RTK/RCPG ce qui induit son maintien au niveau de la membrane plasmique, et l'activation de la signalisation par le ligand du RTK [607, 626-629]. Le traitement des cellules surexprimant NTSR-2 avec l'inhibiteur des dynamines, le Dynasore, empêche l'internalisation du complexe TrkB/NTSR-2 dépendante des clathrines, et induit sa persistance au niveau de la membrane plasmique et ainsi une augmentation de la signalisation induite par cette plateforme TrkB/NTSR-2.

La capacité du récepteur NTSR2 à être recyclé à la membrane plasmique après exposition à la NTS [478, 741], pourrait permettre également, dans notre modèle, d'augmenter l'exposition du complexe membranaire TrkB/NTSR2 au BDNF. NTSR2 jouerait ainsi un rôle de co-activateur de TrkB, mais aussi le rôle d'une protéine de soutien, participant à la persistance de la signalisation induite par le BDNF.

Nous avons également démontré, par gradient de sucrose, que le trafic intracellulaire de NTSR2 concernait, en l'absence de BDNF, les endosomes précoces marqués par EEA1 et tardifs marqués par Rab7. Lors de la surexpression de NTSR2, on observe une rupture du trafic endosomal qui n'aboutit pas à la formation tardive de vésicules à destination lysosomale. L'ajout de BDNF sur les cellules surexprimant NTSR2 rétablit ce trafic. Notre hypothèse est que le BDNF active le complexe TrkB/NTSR2 et le protège de la dégradation lysosomale. Cet excès de complexes internalisés pourrait être libéré par la cellule tumorale sous forme d'exosomes qui contiennent, comme nous l'avons démontré, le complexe TrkB/NTSR2. Ces données sont renforcées par le fait que les exosomes provenant du sérum de patients atteints de LLC sont enrichis en complexe NTSR2/TrkB. De plus, le traitement des cellules surexprimant NTSR2 avec du BDNF induit un décalage de localisation du récepteur NTSR2 aux niveaux des fractions du gradient de sucrose, avec une diminution de la co-expression de NTSR2 avec le marqueur Rab7. En effet, cette GTPase participe activement au trafic endo-lysosomal [742, 743]. Nos résultats montrent un décalage du co-marquage reflétant un potentiel échappement au trafic endo-lysosomal du NTSR2, malgré une localisation au niveau

des MVBs, révélée par la co-localisation au marqueur CD63, ce dernier constituant également un marqueur des exosomes. Ces résultats sont confortés par l'observation d'une diminution de l'expression de la sortiline, qui participe également au trafic endo-lysosomal [489]. Ceci provoque une accumulation des protéines NTSR2 et TrkB, qui s'oligomérisent dans les MVBs, induisant leurs fusions avec la membrane plasmique et la libération des exosomes.

Conclusion et perspectives

L'ensemble de nos résultats mettent en évidence que NTSR2 exerce une fonction de régulation de la survie et de la signalisation lymphocytaire B passant par la formation d'un complexe hétérodimérique RTK/RCPG avec TrkB. L'activation de ce complexe est induite par le ligand de TrkB, le BDNF, par le biais d'une transactivation dépendant de NTSR2 diminuée par un inhibiteur pharmacologique le SR142948A. Ces résultats sont particulièrement intéressants dans le cas des LLC, qui surexpriment NTSR2 et qui se caractérisent par la présence de ce complexe RTK/RCPG.

Ils restent à déterminer la régulation de ce complexe dans ce cadre pathologique, de même que l'importance de l'excrétion exosomale du couple NTSR2/TrkB (i) dans l'interaction de ces cellules avec le microenvironnement tumoral (nurse cells), (ii) dans la prolifération et la survie et enfin (iii) l'échappement à la réponse immune anti-tumorale. En effet, la sécrétion d'exosomes par les cellules de LLC est impliqué dans la survie de ces cellules [744] et dans leur échappement à la mort cellulaire induite par les lymphocytes NK [745].

Parallèlement les cellules de LLC de même que la lignée BL41 surexprimant NTSR2 sont caractérisées par une diminution de l'expression de la sortiline. La fonction de cette protéine dans le trafic intra-cellulaire et la libération des exosomes reste à déterminer dans le modèle de la LLC ; en effet, les travaux de l'équipe ont démontré sa fonction de protéine régulatrice de la sécrétion d'exosomes dans un modèle de cancer bronchique [714]. De plus, la sortiline, dans ce modèle de cancer solide, permet la formation d'un complexe de récepteurs à tyrosine-kinase EGFR-TrkB. Dans notre modèle de LLC, les cellules se caractérisent, à la fois, par une diminution de l'expression transcriptionnelle de la sortiline et par une augmentation de son excrétion exosomale, notamment après activation des lymphocytes B leucémiques. Il reste à déterminer si l'inhibition complète par shRNA de la sortiline résiduelle conduit au blocage de la sécrétion exosomale dans ce modèle.

Il convient également de déterminer le contenu protéique et nucléique (RNA et miR) de ces exosomes. En effet, la sécrétion exosomale de CD20 a été décrite comme mécanisme d'échappement des cellules de lymphomes B au rituximab, un anticorps humanisé anti-CD20 utilisé en thérapeutique humaine dans la LLC. Une

autre hypothèse serait la sécrétion exosomale du récepteur à domaine de mort p75^{NTR}, limitant ainsi l'apoptose induite par la forme immature du BDNF.

La colocalisation de NTSR2 avec NTSR1 mise en évidence à l'état basal dans les lignées B matures induit également un signal de survie. La fonction de NTSR1 dans la LLC reste à déterminer. Bien que son expression transcriptionnelle soit diminuée, sa présence protéique pourrait participer au maintien membranaire du complexe NTSR2/TrkB.

Références bibliographiques

1. Cowen, T. and I. Gavazzi, Plasticity in adult and ageing sympathetic neurons. *Prog Neurobiol*, 1998. 54(3): p. 249-88.
2. Cassiman, D., et al., Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology*, 2001. 33(1): p. 148-58.
3. Kerschensteiner, M., et al., Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med*, 1999. 189(5): p. 865-70.
4. Chao, M.V., Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*, 2003. 4(4): p. 299-309.
5. Bergman, E., B. Ulfhake, and B.T. Fundin, Regulation of NGF-family ligands and receptors in adulthood and senescence: correlation to degenerative and regenerative changes in cutaneous innervation. *Eur J Neurosci*, 2000. 12(8): p. 2694-706.
6. Casaccia-Bonofil, P., H. Kong, and M.V. Chao, Neurotrophins: the biological paradox of survival factors eliciting apoptosis. *Cell Death Differ*, 1998. 5(5): p. 357-64.
7. Casaccia-Bonofil, P., et al., p75 neurotrophin receptor as a modulator of survival and death decisions. *Microsc Res Tech*, 1999. 45(4-5): p. 217-24.
8. Casaccia-Bonofil, P., C. Gu, and M.V. Chao, Neurotrophins in cell survival/death decisions. *Adv Exp Med Biol*, 1999. 468: p. 275-82.
9. Jansen, P., et al., Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat Neurosci*, 2007. 10(11): p. 1449-57.
10. Nykjaer, A. and T.E. Willnow, Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci*, 2012. 35(4): p. 261-70.
11. Fauchais, A.L., et al., Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J Immunol*, 2008. 181(5): p. 3027-38.
12. Bonini, S., et al., Nerve growth factor: neurotrophin or cytokine? *Int Arch Allergy Immunol*, 2003. 131(2): p. 80-4.
13. Levi-Montalcini, R., et al., Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokin. *Trends Neurosci*, 1996. 19(11): p. 514-20.
14. Sariola, H., The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cell Mol Life Sci*, 2001. 58(8): p. 1061-6.
15. Siemion, I.Z., A. Kluczyk, and M. Cebart, The peptide molecular links between the central nervous and the immune systems. *Amino Acids*, 2005. 29(3): p. 161-76.
16. Rosell, S., et al., Plasma concentration of neurotensin-like immunoreactivity (NTLI) and lower esophageal sphincter (LES) pressure in man following infusion of (Gln4)-neurotensin. *Acta Physiol Scand*, 1980. 109(4): p. 369-75.
17. Thor, K., et al., (Gln4)-neurotensin and gastrointestinal motility in man. *Acta Physiol Scand*, 1980. 110(3): p. 327-8.
18. Bozzola, M., et al., Possible role of plasma neurotensin on growth hormone regulation in neonates. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 1998. 11(5): p. 607-13.
19. Bozzola, M., et al., Plasma neurotensin levels in prepubertal children and adults: possible involvement in the regulation of growth hormone secretion. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 1998. 11(5): p. 615-21.
20. Iguchi, A., et al., Glucoregulatory effects of intrahypothalamic injections of bombesin and other peptides. *Endocrinology*, 1984. 114(6): p. 2242-6.
21. Remaury, A., et al., Targeted inactivation of the neurotensin type 1 receptor reveals its role in body temperature control and feeding behavior but not in analgesia. *Brain Res*, 2002. 953(1-2): p. 63-72.

22. Devader, C., et al., The anti-apoptotic role of neurotensin. *Cells*, 2013. 2(1): p. 124-35.
23. Wu, Z., et al., Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012. 3: p. 184.
24. Levi-Montalcini, R. and S. Cohen, In Vitro and in Vivo Effects of a Nerve Growth-Stimulating Agent Isolated from Snake Venom. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1956. 42(9): p. 695-9.
25. Levi-Montalcini, R., H. Meyer, and V. Hamburger, In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Cancer Res*, 1954. 14(1): p. 49-57.
26. Cohen, S., R. Levi-Montalcini, and V. Hamburger, A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcomas 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1954. 40(10): p. 1014-8.
27. Cohen, S. and R. Levi-Montalcini, A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Snake Venom. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1956. 42(9): p. 571-4.
28. Weltman, J.K., The 1986 Nobel Prize for Physiology or Medicine awarded for discovery of growth factors: Rita Levi-Montalcini, M.D., and Stanley Cohen, Ph.D. *N Engl J Med*, 1987. 316(1): p. 47-8.
29. Barde, Y.A., D. Edgar, and H. Thoenen, Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*, 1982. 1(5): p. 549-53.
30. Hohn, A., et al., Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature*, 1990. 344(6264): p. 339-41.
31. Maisonpierre, P.C., et al., Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*, 1990. 247(4949 Pt 1): p. 1446-51.
32. Jones, K.R. and L.F. Reichardt, Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(20): p. 8060-4.
33. Hallbook, F., C.F. Ibanez, and H. Persson, Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron*, 1991. 6(5): p. 845-58.
34. Berkemeier, L.R., et al., Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron*, 1991. 7(5): p. 857-66.
35. Gotz, R., et al., Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature*, 1994. 372(6503): p. 266-9.
36. Lai, K.O., et al., Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci*, 1998. 11(1-2): p. 64-76.
37. Hallbook, F., Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr Opin Neurobiol*, 1999. 9(5): p. 616-21.
38. Maisonpierre, P.C., et al., NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron*, 1990. 5(4): p. 501-9.
39. Jones, K.R., et al., Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell*, 1994. 76(6): p. 989-99.
40. Lewin, G.R. and Y.A. Barde, Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci*, 1996. 19: p. 289-317.
41. Barres, B.A. and M.C. Raff, Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve. *Neuron*, 1994. 12(5): p. 935-42.
42. Peterson, G.M., G.W. Lanford, and E.W. Powell, Fate of septohippocampal neurons following fimbria-fornix transection: a time course analysis. *Brain Res Bull*, 1990. 25(1): p. 129-37.
43. Naumann, T., G.M. Peterson, and M. Frotscher, Fine structure of rat septohippocampal neurons: II. A time course analysis following axotomy. *J Comp Neurol*, 1992. 325(2): p. 219-42.
44. Fischer, W., et al., Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature*, 1987. 329(6134): p. 65-8.

45. Crowley, C., et al., Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell*, 1994. 76(6): p. 1001-11.
46. Kanaka-Gantenbein, C., et al., Presence of nerve growth factor and its receptors in an in vitro model of islet cell development: implication in normal islet morphogenesis. *Endocrinology*, 1995. 136(7): p. 3154-62.
47. Kolbeck, R., S. Jungbluth, and Y.A. Barde, Characterisation of neurotrophin dimers and monomers. *Eur J Biochem*, 1994. 225(3): p. 995-1003.
48. Lessmann, V., K. Gottmann, and M. Malcangio, Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol*, 2003. 69(5): p. 341-74.
49. McDonald, N.Q. and M.V. Chao, Structural determinants of neurotrophin action. *J Biol Chem*, 1995. 270(34): p. 19669-72.
50. Halban, P.A. and J.C. Irminger, Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem J*, 1994. 299 (Pt 1): p. 1-18.
51. Khatib, A.M., et al., Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. *Am J Pathol*, 2002. 160(6): p. 1921-35.
52. Seidah, N.G., et al., Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J*, 1996. 314 (Pt 3): p. 951-60.
53. Lee, R., et al., Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 2001. 294(5548): p. 1945-8.
54. Pang, P.T., et al., Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*, 2004. 306(5695): p. 487-91.
55. Pulciani, S., et al., Oncogenes in solid human tumours. *Nature*, 1982. 300(5892): p. 539-42.
56. Martin-Zanca, D., S.H. Hughes, and M. Barbacid, A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature*, 1986. 319(6056): p. 743-8.
57. Klein, R., et al., The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell*, 1991. 65(1): p. 189-97.
58. Klein, R., et al., The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell*, 1991. 66(2): p. 395-403.
59. Squinto, S.P., et al., trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell*, 1991. 65(5): p. 885-93.
60. Klein, R., et al., The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron*, 1992. 8(5): p. 947-56.
61. Lamballe, F., R. Klein, and M. Barbacid, trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell*, 1991. 66(5): p. 967-79.
62. Ryden, M. and C.F. Ibanez, Binding of neurotrophin-3 to p75LNGFR, TrkA, and TrkB mediated by a single functional epitope distinct from that recognized by trkC. *J Biol Chem*, 1996. 271(10): p. 5623-7.
63. Kaplan, D.R., D. Martin-Zanca, and L.F. Parada, Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature*, 1991. 350(6314): p. 158-60.
64. Watson, F.L., et al., TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J Neurobiol*, 1999. 39(2): p. 323-36.
65. Arevalo, J.C., et al., TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(16): p. 5908-16.
66. Uren, R.T., et al., A novel role of suppressor of cytokine signaling-2 in the regulation of TrkA neurotrophin receptor biology. *J Neurochem*, 2014. 129(4): p. 614-27.
67. Nakagawara, A., et al., Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics*, 1995. 25(2): p. 538-46.

68. Bradshaw, R.A., et al., Receptor tyrosine kinase signaling mechanisms: Devolving TrkA responses with phosphoproteomics. *Adv Biol Regul*, 2013. 53(1): p. 87-96.
69. Barbacid, M., The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol*, 1994. 25(11): p. 1386-403.
70. Lei, L. and L.F. Parada, Transcriptional regulation of Trk family neurotrophin receptors. *Cell Mol Life Sci*, 2007. 64(5): p. 522-32.
71. Barbacid, M., Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. 766: p. 442-58.
72. Urfer, R., et al., An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *EMBO J*, 1995. 14(12): p. 2795-805.
73. Perez, P., et al., NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. *Mol Cell Neurosci*, 1995. 6(2): p. 97-105.
74. Windisch, J.M., et al., Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 bind to a single leucine-rich motif of TrkB. *Biochemistry*, 1995. 34(35): p. 11256-63.
75. Windisch, J.M., et al., Specific neurotrophin binding to leucine-rich motif peptides of TrkA and TrkB. *FEBS Lett*, 1995. 374(1): p. 125-9.
76. Windisch, J.M., R. Marksteiner, and R. Schneider, Nerve growth factor binding site on TrkA mapped to a single 24-amino acid leucine-rich motif. *J Biol Chem*, 1995. 270(47): p. 28133-8.
77. Torres, M. and E. Bogenmann, Nerve growth factor induces a multimeric TrkA receptor complex in neuronal cells that includes Crk, SHC and PLC-gamma 1 but excludes P130CAS. *Oncogene*, 1996. 12(1): p. 77-86.
78. Eide, F.F., et al., Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci*, 1996. 16(10): p. 3123-9.
79. Patapoutian, A. and L.F. Reichardt, Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol*, 2001. 11(3): p. 272-80.
80. Barker, P.A., et al., Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J Biol Chem*, 1993. 268(20): p. 15150-7.
81. Clary, D.O. and L.F. Reichardt, An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(23): p. 11133-7.
82. Brodeur, G.M., et al., Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(10): p. 3244-50.
83. Saada, S., et al., Differential expression of neurotensin and specific receptors, NTSR1 and NTSR2, in normal and malignant human B lymphocytes. *J Immunol*, 2012. 189(11): p. 5293-303.
84. Tacconelli, A., et al., TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell*, 2004. 6(4): p. 347-60.
85. Tacconelli, A., et al., TrkAIII. A novel hypoxia-regulated alternative TrkA splice variant of potential physiological and pathological importance. *Cell Cycle*, 2005. 4(1): p. 8-9.
86. Tacconelli, A., et al., TrkAIII expression in the thymus. *J Neuroimmunol*, 2007. 183(1-2): p. 151-61.
87. Smeyne, R.J., et al., Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature*, 1994. 368(6468): p. 246-9.
88. Stoilov, P., E. Castren, and S. Stamm, Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 290(3): p. 1054-65.
89. Luberg, K., et al., Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *J Neurochem*, 2010. 113(4): p. 952-64.

90. Middlemas, D.S., R.A. Lindberg, and T. Hunter, trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol*, 1991. 11(1): p. 143-53.
91. Biffo, S., et al., Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development*, 1995. 121(8): p. 2461-70.
92. Fenner, B.M., Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2012. 23(1-2): p. 15-24.
93. Rose, C.R., et al., Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature*, 2003. 426(6962): p. 74-8.
94. Ohira, K., et al., TrkB-T1 regulates the RhoA signaling and actin cytoskeleton in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 342(3): p. 867-74.
95. Offenhauser, N., V. Muzio, and S. Biffo, BDNF binding to truncated trkB.T1 does not affect gene expression. *Neuroreport*, 2002. 13(9): p. 1189-93.
96. Yacoubian, T.A. and D.C. Lo, Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth. *Nat Neurosci*, 2000. 3(4): p. 342-9.
97. Knusel, B., et al., Regulated neurotrophin receptor responsiveness during neuronal migration and early differentiation. *J Neurosci*, 1994. 14(3 Pt 2): p. 1542-54.
98. Fryer, R.H., D.R. Kaplan, and L.F. Kromer, Truncated trkB receptors on nonneuronal cells inhibit BDNF-induced neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol*, 1997. 148(2): p. 616-27.
99. Haapasalo, A., et al., Truncated trkB.T1 is dominant negative inhibitor of trkB.TK+-mediated cell survival. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 280(5): p. 1352-8.
100. Klein, R., et al., Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell*, 1993. 75(1): p. 113-22.
101. Guiton, M., et al., Naturally occurring tyrosine kinase inserts block high affinity binding of phospholipase C gamma and Shc to TrkC and neurotrophin-3 signaling. *J Biol Chem*, 1995. 270(35): p. 20384-90.
102. Tsoulfas, P., et al., TrkC isoforms with inserts in the kinase domain show impaired signaling responses. *J Biol Chem*, 1996. 271(10): p. 5691-7.
103. McGregor, L.M., et al., Molecular cloning of the cDNA for human TrkC (NTRK3), chromosomal assignment, and evidence for a splice variant. *Genomics*, 1994. 22(2): p. 267-72.
104. Shelton, D.L., et al., Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci*, 1995. 15(1 Pt 2): p. 477-91.
105. Menn, B., et al., Differential expression of TrkC catalytic and noncatalytic isoforms suggests that they act independently or in association. *J Comp Neurol*, 1998. 401(1): p. 47-64.
106. Tessarollo, L., et al., Targeted deletion of all isoforms of the trkC gene suggests the use of alternate receptors by its ligand neurotrophin-3 in neuronal development and implicates trkC in normal cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(26): p. 14776-81.
107. Klein, R., et al., Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene trkC eliminates Ia muscle afferents and results in abnormal movements. *Nature*, 1994. 368(6468): p. 249-51.
108. Ernfors, P., et al., Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell*, 1994. 77(4): p. 503-12.
109. Zhou, X.F., D. Cameron, and R.A. Rush, Endogenous neurotrophin-3 supports the survival of a subpopulation of sensory neurons in neonatal rat. *Neuroscience*, 1998. 86(4): p. 1155-64.
110. Matsuo, S., et al., Proprioceptive afferents survive in the masseter muscle of trkC knockout mice. *Neuroscience*, 2000. 95(1): p. 209-16.
111. Kucera, J., et al., Dependence of developing group Ia afferents on neurotrophin-3. *J Comp Neurol*, 1995. 363(2): p. 307-20.
112. Shamovsky, I.L., et al., The interaction of neurotrophins with the p75NTR common neurotrophin receptor: a comprehensive molecular modeling study. *Protein Sci*, 1999. 8(11): p. 2223-33.

113. Roux, P.P. and P.A. Barker, Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol*, 2002. 67(3): p. 203-33.
114. Mukai, J., et al., NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem*, 2000. 275(23): p. 17566-70.
115. Khursigara, G., et al., A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci*, 2001. 21(16): p. 5854-63.
116. Gehler, S., et al., p75 neurotrophin receptor signaling regulates growth cone filopodial dynamics through modulating RhoA activity. *J Neurosci*, 2004. 24(18): p. 4363-72.
117. Liepinsh, E., et al., NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J*, 1997. 16(16): p. 4999-5005.
118. Dechant, G. and Y.A. Barde, Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr Opin Neurobiol*, 1997. 7(3): p. 413-8.
119. Arevalo, J.C. and S.H. Wu, Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci*, 2006. 63(13): p. 1523-37.
120. Ahmed, Z., et al., TACE-induced cleavage of NgR and p75NTR in dorsal root ganglion cultures disinhibits outgrowth and promotes branching of neurites in the presence of inhibitory CNS myelin. *FASEB J*, 2006. 20(11): p. 1939-41.
121. Bronfman, F.C., Metalloproteases and gamma-secretase: new membrane partners regulating p75 neurotrophin receptor signaling? *J Neurochem*, 2007. 103 Suppl 1: p. 91-100.
122. Kenchappa, R.S., et al., p75 neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves a biphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme/ADAM17. *J Biol Chem*, 2010. 285(26): p. 20358-68.
123. Podlesniy, P., et al., Pro-NGF from Alzheimer's disease and normal human brain displays distinctive abilities to induce processing and nuclear translocation of intracellular domain of p75NTR and apoptosis. *Am J Pathol*, 2006. 169(1): p. 119-31.
124. Matusica, D., et al., An intracellular domain fragment of the p75 neurotrophin receptor (p75(NTR)) enhances tropomyosin receptor kinase A (TrkA) receptor function. *J Biol Chem*, 2013. 288(16): p. 11144-54.
125. Mattson, M.P. and M.K. Meffert, Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ*, 2006. 13(5): p. 852-60.
126. Geetha, T., et al., TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor. *EMBO J*, 2005. 24(22): p. 3859-68.
127. Linggi, M.S., et al., Neurotrophin receptor interacting factor (NRIF) is an essential mediator of apoptotic signaling by the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem*, 2005. 280(14): p. 13801-8.
128. Kenchappa, R.S., et al., Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron*, 2006. 50(2): p. 219-32.
129. Casademunt, E., et al., The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *EMBO J*, 1999. 18(21): p. 6050-61.
130. Nykjaer, A., T.E. Willnow, and C.M. Petersen, p75NTR--live or let die. *Curr Opin Neurobiol*, 2005. 15(1): p. 49-57.
131. Salehi, A.H., S. Xanthoudakis, and P.A. Barker, NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *J Biol Chem*, 2002. 277(50): p. 48043-50.
132. Wen, C.J., et al., hNRAGE, a human neurotrophin receptor interacting MAGE homologue, regulates p53 transcriptional activity and inhibits cell proliferation. *FEBS Lett*, 2004. 564(1-2): p. 171-6.

133. Chittka, A., et al., The p75NTR-interacting protein SC1 inhibits cell cycle progression by transcriptional repression of cyclin E. *J Cell Biol*, 2004. 164(7): p. 985-96.
134. Kendall, S.E., et al., Characterization of NADE, NRIF and SC-1 gene expression during mouse neurogenesis. *Brain Res Dev Brain Res*, 2003. 144(2): p. 151-8.
135. Chittka, A. and M.V. Chao, Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(19): p. 10705-10.
136. Park, J.A., et al., Co-induction of p75NTR and p75NTR-associated death executor in neurons after zinc exposure in cortical culture or transient ischemia in the rat. *J Neurosci*, 2000. 20(24): p. 9096-103.
137. Kimura, M.T., et al., 14-3-3 is involved in p75 neurotrophin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem*, 2001. 276(20): p. 17291-300.
138. Mukai, J., P. Suvant, and T.A. Sato, Nerve growth factor-dependent regulation of NADE-induced apoptosis. *Vitam Horm*, 2003. 66: p. 385-402.
139. Yi, J.S., et al., Co-induction of p75(NTR) and the associated death executor NADE in degenerating hippocampal neurons after kainate-induced seizures in the rat. *Neurosci Lett*, 2003. 347(2): p. 126-30.
140. Provenzano, M.J., et al., p75(NTR) expression and nuclear localization of p75(NTR) intracellular domain in spiral ganglion Schwann cells following deafness correlate with cell proliferation. *Mol Cell Neurosci*, 2011. 47(4): p. 306-15.
141. Carter, B.D., et al., Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science*, 1996. 272(5261): p. 542-5.
142. Cosgaya, J.M. and E.M. Shooter, Binding of nerve growth factor to its p75 receptor in stressed cells induces selective IkappaB-beta degradation and NF-kappaB nuclear translocation. *J Neurochem*, 2001. 79(2): p. 391-9.
143. Bhakar, A.L., et al., The p75 neurotrophin receptor (p75NTR) alters tumor necrosis factor-mediated NF-kappaB activity under physiological conditions, but direct p75NTR-mediated NF-kappaB activation requires cell stress. *J Biol Chem*, 1999. 274(30): p. 21443-9.
144. Mamidipudi, V., X. Li, and M.W. Wooten, Identification of interleukin 1 receptor-associated kinase as a conserved component in the p75-neurotrophin receptor activation of nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem*, 2002. 277(31): p. 28010-8.
145. Mamidipudi, V., et al., Regulation of interleukin receptor-associated kinase (IRAK) phosphorylation and signaling by iota protein kinase C. *J Biol Chem*, 2004. 279(6): p. 4161-5.
146. Wooten, M.W., et al., The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor. *J Biol Chem*, 2001. 276(11): p. 7709-12.
147. Yamashita, T. and M. Tohyama, The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci*, 2003. 6(5): p. 461-7.
148. Mi, S., et al., LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci*, 2004. 7(3): p. 221-8.
149. Barker, P.A., p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron*, 2004. 42(4): p. 529-33.
150. Hempstead, B.L., et al., High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*, 1991. 350(6320): p. 678-83.
151. Petersen, C.M., et al., Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem*, 1997. 272(6): p. 3599-605.
152. Nielsen, M.S., et al., The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J*, 2001. 20(9): p. 2180-90.
153. Chen, Z.Y., et al., Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J Neurosci*, 2005. 25(26): p. 6156-66.

154. Teng, H.K., et al., ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*, 2005. 25(22): p. 5455-63.
155. Nykjaer, A., et al., Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, 2004. 427(6977): p. 843-8.
156. Hempstead, B.L., Dissecting the diverse actions of pro- and mature neurotrophins. *Curr Alzheimer Res*, 2006. 3(1): p. 19-24.
157. Volosin, M., et al., Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. *J Neurosci*, 2006. 26(29): p. 7756-66.
158. Fahnstock, M., et al., The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci*, 2001. 18(2): p. 210-20.
159. Peng, S., et al., Increased proNGF levels in subjects with mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004. 63(6): p. 641-9.
160. Pedraza, C.E., et al., Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR. *Am J Pathol*, 2005. 166(2): p. 533-43.
161. Stoica, G., et al., Up-regulation of pro-nerve growth factor, neurotrophin receptor p75, and sortilin is associated with retrovirus-induced spongiform encephalomyelopathy. *Brain Res*, 2008. 1208: p. 204-16.
162. Chen, L.W., et al., The proNGF-p75NTR-sortilin signalling complex as new target for the therapeutic treatment of Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2008. 7(6): p. 512-23.
163. Al-Shawi, R., et al., ProNGF, sortilin, and age-related neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. 1119: p. 208-15.
164. Al-Shawi, R., et al., Neurotoxic and neurotrophic roles of proNGF and the receptor sortilin in the adult and ageing nervous system. *Eur J Neurosci*, 2008. 27(8): p. 2103-14.
165. Vaegter, C.B., et al., Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat Neurosci*, 2011. 14(1): p. 54-61.
166. Berczi, I., The stress concept and neuroimmunoregulation in modern biology. *Ann N Y Acad Sci*, 1998. 851: p. 3-12.
167. Aloe, L. and R. Levi-Montalcini, Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor. *Brain Res*, 1977. 133(2): p. 358-66.
168. Horigome, K., et al., Mediator release from mast cells by nerve growth factor. Neurotrophin specificity and receptor mediation. *J Biol Chem*, 1993. 268(20): p. 14881-7.
169. Laudiero, L.B., E. Vigneti, and L. Aloe, In vivo and in vitro effect of NGF on bursa of Fabricius cells during chick embryo development. *Int J Neurosci*, 1991. 59(1-3): p. 189-98.
170. Bracci-Laudiero, L., et al., NGF retards apoptosis in chick embryo bursal cell in vitro. *Differentiation*, 1993. 53(2): p. 61-6.
171. Yamamoto, M., et al., Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. *Neurochem Res*, 1996. 21(8): p. 929-38.
172. Labouyrie, E., et al., Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am J Pathol*, 1999. 154(2): p. 405-15.
173. Auffray, I., et al., Nerve growth factor is involved in the supportive effect by bone marrow--derived stromal cells of the factor-dependent human cell line UT-7. *Blood*, 1996. 88(5): p. 1608-18.
174. von Freeden-Jeffry, U., et al., Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med*, 1995. 181(4): p. 1519-26.
175. Hannestad, J., et al., TrkA neurotrophin receptor protein in the rat and human thymus. *Anat Rec*, 1997. 249(3): p. 373-9.

176. Maroder, M., et al., Expression of trkB neurotrophin receptor during T cell development. Role of brain derived neurotrophic factor in immature thymocyte survival. *J Immunol*, 1996. 157(7): p. 2864-72.
177. Garcia-Suarez, O., et al., Massive lymphocyte apoptosis in the thymus of functionally deficient TrkB mice. *J Neuroimmunol*, 2002. 129(1-2): p. 25-34.
178. Matsuda, H., et al., Nerve growth factor promotes human hemopoietic colony growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(17): p. 6508-12.
179. Kannan, Y., et al., Murine granulocyte-macrophage and mast cell colony formation promoted by nerve growth factor. *Int Arch Allergy Immunol*, 1993. 102(4): p. 362-7.
180. Chevalier, S., et al., Expression and functionality of the trkA proto-oncogene product/NGF receptor in undifferentiated hematopoietic cells. *Blood*, 1994. 83(6): p. 1479-85.
181. Torcia, M., et al., Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell*, 1996. 85(3): p. 345-56.
182. Aloe, L., et al., Nerve growth factor and autoimmune diseases. *Autoimmunity*, 1994. 19(2): p. 141-50.
183. Coppola, V., et al., Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities. *Development*, 2004. 131(20): p. 5185-95.
184. Kimata, H., et al., Stimulation of Ig production and growth of human lymphoblastoid B-cell lines by nerve growth factor. *Immunology*, 1991. 72(3): p. 451-2.
185. Kimata, H., et al., Nerve growth factor inhibits immunoglobulin production by but not proliferation of human plasma cell lines. *Clin Immunol Immunopathol*, 1991. 60(1): p. 145-51.
186. Brodie, C. and E.W. Gelfand, Regulation of immunoglobulin production by nerve growth factor: comparison with anti-CD40. *J Neuroimmunol*, 1994. 52(1): p. 87-96.
187. Brodie, C., et al., Nerve growth-factor and anti-CD40 provide opposite signals for the production of IgE in interleukin-4-treated lymphocytes. *Eur J Immunol*, 1996. 26(1): p. 171-8.
188. Kimata, H., et al., Erythropoietin enhances immunoglobulin production and proliferation by human plasma cells in a serum-free medium. *Clin Immunol Immunopathol*, 1991. 59(3): p. 495-501.
189. Otten, U., P. Ehrhard, and R. Peck, Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(24): p. 10059-63.
190. Santambrogio, L., et al., Nerve growth factor production by lymphocytes. *J Immunol*, 1994. 153(10): p. 4488-95.
191. Torcia, M., et al., Nerve growth factor inhibits apoptosis in memory B lymphocytes via inactivation of p38 MAPK, prevention of Bcl-2 phosphorylation, and cytochrome c release. *J Biol Chem*, 2001. 276(42): p. 39027-36.
192. Brodie, C. and E.W. Gelfand, Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2. *J Immunol*, 1992. 148(11): p. 3492-7.
193. Thorpe, L.W., K. Werrbach-Perez, and J.R. Perez-Polo, Effects of nerve growth factor on the expression of interleukin-2 receptors on cultured human lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 1987. 496: p. 310-1.
194. Franklin, R.A., et al., Nerve growth factor induces activation of MAP-kinase and p90rsk in human B lymphocytes. *J Immunol*, 1995. 154(10): p. 4965-72.
195. Finkelman, F.D., et al., Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol*, 1990. 8: p. 303-33.
196. Heese, K., N. Inoue, and T. Sawada, NF-kappaB regulates B-cell-derived nerve growth factor expression. *Cell Mol Immunol*, 2006. 3(1): p. 63-6.
197. Fauchais, A.L., et al., Serum and lymphocytic neurotrophins profiles in systemic lupus erythematosus: a case-control study. *PLoS One*, 2013. 8(11): p. e79414.
198. Bracci-Laudiero, L., et al., NGF modulates CGRP synthesis in human B-lymphocytes: a possible anti-inflammatory action of NGF? *J Neuroimmunol*, 2002. 123(1-2): p. 58-65.

199. Melamed, I., et al., Nerve growth factor triggers microfilament assembly and paxillin phosphorylation in human B lymphocytes. *J Exp Med*, 1995. 181(3): p. 1071-9.
200. Bellanger, C., et al., Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. *PLoS One*, 2011. 6(11): p. e27213.
201. Edling, A.E., et al., Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells. *J Neurosci Res*, 2004. 77(5): p. 709-17.
202. Barouch, R., et al., Differential regulation of neurotrophin expression by mitogens and neurotransmitters in mouse lymphocytes. *J Neuroimmunol*, 2000. 103(2): p. 112-21.
203. Hu, Y., et al., Brain-derived neurotrophic factor promotes growth and migration of multiple myeloma cells. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006. 169(1): p. 12-20.
204. Fauchais, A.L., et al., Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor correlate with T-cell activation in primary Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol*, 2009. 38(1): p. 50-7.
205. Colombo, E., et al., Autocrine and immune cell-derived BDNF in human skeletal muscle: implications for myogenesis and tissue regeneration. *J Pathol*, 2013. 231(2): p. 190-8.
206. Kimata, H., Enhancement of allergic skin wheal responses and in vitro allergen-specific IgE production by computer-induced stress in patients with atopic dermatitis. *Brain Behav Immun*, 2003. 17(2): p. 134-8.
207. Kimata, H., Listening to mozart reduces allergic skin wheal responses and in vitro allergen-specific IgE production in atopic dermatitis patients with latex allergy. *Behav Med*, 2003. 29(1): p. 15-9.
208. Kimata, H., Brain-derived neurotrophic factor selectively enhances allergen-specific IgE production. *Neuropeptides*, 2005. 39(4): p. 379-83.
209. Besser, M. and R. Wank, Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors. *J Immunol*, 1999. 162(11): p. 6303-6.
210. D'Onofrio, M., et al., Expression of neurotrophin receptors in normal and malignant B lymphocytes. *Eur Cytokine Netw*, 2000. 11(2): p. 283-91.
211. Xia, D., et al., RNA interference-mediated knockdown of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes cell cycle arrest and apoptosis in B-cell lymphoma cells. *Neoplasma*, 2014. 61(5): p. 523-32.
212. Pearce, R.N., et al., A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood*, 2005. 105(11): p. 4429-36.
213. Sun, C., et al., The effect of brain-derived neurotrophic factor on angiogenesis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2009. 29(2): p. 139-43.
214. Sun, C.Y., et al., Brain-derived neurotrophic factor induces proliferation, migration, and VEGF secretion in human multiple myeloma cells via activation of MEK-ERK and PI3K/AKT signaling. *Tumour Biol*, 2010. 31(2): p. 121-8.
215. Zhang, L., et al., Lentiviral shRNA silencing of BDNF inhibits in vivo multiple myeloma growth and angiogenesis via down-regulated stroma-derived VEGF expression in the bone marrow milieu. *Cancer Sci*, 2010. 101(5): p. 1117-24.
216. Chu, Z.B., et al., Role of brain-derived neurotrophic factor in bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2013. 33(4): p. 485-90.
217. Sun, C.Y., et al., Brain-derived neurotrophic factor is a potential osteoclast stimulating factor in multiple myeloma. *Int J Cancer*, 2012. 130(4): p. 827-36.
218. Ai, L.S., et al., Gene silencing of the BDNF/TrkB axis in multiple myeloma blocks bone destruction and tumor burden in vitro and in vivo. *Int J Cancer*, 2013. 133(5): p. 1074-84.
219. Li, Z., et al., High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis. *Blood*, 2009. 113(9): p. 2028-37.
220. Abram, M., et al., Nerve growth factor and neurotrophin-3 mediate survival of pulmonary plasma cells during the allergic airway inflammation. *J Immunol*, 2009. 182(8): p. 4705-12.

221. Ehrhard, P.B., et al., Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(23): p. 10984-8.
222. Ehrhard, P.B., et al., Expression of functional trk tyrosine kinase receptors after T cell activation. *J Immunol*, 1994. 152(6): p. 2705-9.
223. Lambiase, A., et al., Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J Allergy Clin Immunol*, 1997. 100(3): p. 408-14.
224. Thorpe, L.W., T.R. Jerrells, and J.R. Perez-Polo, Mechanisms of lymphocyte activation by nerve growth factor. *Ann N Y Acad Sci*, 1990. 594: p. 78-84.
225. Truyen, E., et al., Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. *Thorax*, 2006. 61(3): p. 202-8.
226. Ishiura, Y., et al., Th2 cytokine inhibition and cough in asthmatic and bronchitic patients. *Ann Med*, 2004. 36(8): p. 623-9.
227. Wilson, R.H., et al., Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. 180(8): p. 720-30.
228. Shi, Y., et al., Blockage of nerve growth factor modulates T cell responses and inhibits allergic inflammation in a mouse model of asthma. *Inflamm Res*, 2012. 61(12): p. 1369-78.
229. Moalem, G., et al., Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *J Autoimmun*, 2000. 15(3): p. 331-45.
230. Weinstock-Guttman, B., et al., Immune cell BDNF secretion is associated with white matter volume in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 2007. 188(1-2): p. 167-74.
231. Ziemssen, T., et al., Glatiramer acetate-specific T-helper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy. *Brain-derived neurotrophic factor. Brain*, 2002. 125(Pt 11): p. 2381-91.
232. Schuhmann, B., et al., A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. *J Neuroimmunol*, 2005. 163(1-2): p. 15-23.
233. Serpe, C.J., et al., Brain-derived neurotrophic factor supports facial motoneuron survival after facial nerve transection in immunodeficient mice. *Brain Behav Immun*, 2005. 19(2): p. 173-80.
234. Serpe, C.J., et al., CD4+ T, but not CD8+ or B, lymphocytes mediate facial motoneuron survival after facial nerve transection. *Brain Behav Immun*, 2003. 17(5): p. 393-402.
235. Xin, J., et al., CD4+ T cell-mediated neuroprotection is independent of T cell-derived BDNF in a mouse facial nerve axotomy model. *Brain Behav Immun*, 2012. 26(6): p. 886-90.
236. Sekimoto, M., et al., Functional expression of the TrkC gene, encoding a high affinity receptor for NT-3, in antigen-specific T helper type 2 (Th2) cells. *Immunol Lett*, 2003. 88(3): p. 221-6.
237. Chen, Q., G.M. Smith, and H.D. Shine, Immune activation is required for NT-3-induced axonal plasticity in chronic spinal cord injury. *Exp Neurol*, 2008. 209(2): p. 497-509.
238. Chen, Q. and H.D. Shine, Neuroimmune processes associated with Wallerian degeneration support neurotrophin-3-induced axonal sprouting in the injured spinal cord. *J Neurosci Res*, 2013. 91(10): p. 1280-91.
239. Nassenstein, C., et al., Differential expression of the neurotrophin receptors p75NTR, TrkA, TrkB and TrkC in human peripheral blood mononuclear cells. *Exp Toxicol Pathol*, 2006. 57 Suppl 2: p. 55-63.
240. Rogers, M.L., et al., ProNGF mediates death of Natural Killer cells through activation of the p75NTR-sortilin complex. *J Neuroimmunol*, 2010. 226(1-2): p. 93-103.
241. Ralainirina, N., et al., Mouse natural killer (NK) cells express the nerve growth factor receptor TrkA, which is dynamically regulated. *PLoS One*, 2010. 5(12): p. e15053.

242. Hammarberg, H., et al., Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J Neurosci*, 2000. 20(14): p. 5283-91.
243. Schulte-Herbruggen, O., et al., Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 regulate secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes. *J Neuroimmunol*, 2005. 160(1-2): p. 204-9.
244. Ehrhard, P.B., et al., Expression of functional trk protooncogene in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(12): p. 5423-7.
245. la Sala, A., et al., Ligand activation of nerve growth factor receptor TrkA protects monocytes from apoptosis. *J Leukoc Biol*, 2000. 68(1): p. 104-10.
246. Vega, J.A., et al., Neurotrophins and the immune system. *J Anat*, 2003. 203(1): p. 1-19.
247. Schober, A., et al., Distinct populations of macrophages in the adult rat adrenal gland: a subpopulation with neurotrophin-4-like immunoreactivity. *Cell Tissue Res*, 1998. 291(3): p. 365-73.
248. Garaci, E., et al., Nerve growth factor is an autocrine factor essential for the survival of macrophages infected with HIV. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(24): p. 14013-8.
249. Samah, B., et al., Nerve growth factor stimulation promotes CXCL-12 attraction of monocytes but decreases human immunodeficiency virus replication in attracted population. *J Neurovirol*, 2009. 15(1): p. 71-80.
250. Samah, B., F. Porcheray, and G. Gras, Neurotrophins modulate monocyte chemotaxis without affecting macrophage function. *Clin Exp Immunol*, 2008. 151(3): p. 476-86.
251. Blank, T., T. Goldmann, and M. Prinz, Microglia fuel the learning brain. *Trends Immunol*, 2014. 35(4): p. 139-40.
252. Aloe, L., et al., The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy*, 1997. 52(9): p. 883-94.
253. Otten, U. and R.A. Gadiant, Neurotrophins and cytokines--intermediaries between the immune and nervous systems. *Int J Dev Neurosci*, 1995. 13(3-4): p. 147-51.
254. Nilsson, G., et al., Human mast cells express functional TrkA and are a source of nerve growth factor. *Eur J Immunol*, 1997. 27(9): p. 2295-301.
255. Tam, S.Y., et al., Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in the HMC-1 human mast cell line and in human mast cells. *Blood*, 1997. 90(5): p. 1807-20.
256. Xiang, Z. and G. Nilsson, IgE receptor-mediated release of nerve growth factor by mast cells. *Clin Exp Allergy*, 2000. 30(10): p. 1379-86.
257. Leon, A., et al., Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(9): p. 3739-43.
258. Aloe, L., P. Tirassa, and L. Bracci-Laudiero, Nerve growth factor in neurological and non-neurological diseases: basic findings and emerging pharmacological perspectives. *Curr Pharm Des*, 2001. 7(2): p. 113-23.
259. Kassel, O., et al., Local increase in the number of mast cells and expression of nerve growth factor in the bronchus of asthmatic patients after repeated inhalation of allergen at low-dose. *Clin Exp Allergy*, 2001. 31(9): p. 1432-40.
260. Raap, U., et al., Modulation of neurotrophin and neurotrophin receptor expression in nasal mucosa after nasal allergen provocation in allergic rhinitis. *Allergy*, 2008. 63(4): p. 468-75.
261. Kawamoto, K., et al., Nerve growth factor prevents apoptosis of rat peritoneal mast cells through the trk proto-oncogene receptor. *Blood*, 1995. 86(12): p. 4638-44.
262. Aloe, L. and R. De Simone, NGF primed spleen cells injected in brain of developing rats differentiate into mast cells. *Int J Dev Neurosci*, 1989. 7(6): p. 565-73.
263. Nassenstein, C., et al., The neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 are survival and activation factors for eosinophils in patients with allergic bronchial asthma. *J Exp Med*, 2003. 198(3): p. 455-67.

264. Noga, O., et al., The production, storage and release of the neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics. *Clin Exp Allergy*, 2003. 33(5): p. 649-54.
265. Raap, U., et al., Brain-derived neurotrophic factor is increased in atopic dermatitis and modulates eosinophil functions compared with that seen in nonatopic subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. 115(6): p. 1268-75.
266. Raap, U., et al., Circulating levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with disease severity in the intrinsic type of atopic dermatitis. *Allergy*, 2006. 61(12): p. 1416-8.
267. Raap, U., et al., Differential up-regulation of neurotrophin receptors and functional activity of neurotrophins on peripheral blood eosinophils of patients with allergic rhinitis, atopic dermatitis and nonatopic subjects. *Clin Exp Allergy*, 2008. 38(9): p. 1493-8.
268. Hahn, C., et al., Airway epithelial cells produce neurotrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 117(4): p. 787-94.
269. Tsuda, T., et al., Synergistic effects of nerve growth factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on human basophilic cell differentiation. *Blood*, 1991. 77(5): p. 971-9.
270. Gibbs, B.F., D. Zillikens, and J. Grabbe, Nerve growth factor influences IgE-mediated human basophil activation: functional properties and intracellular mechanisms compared with IL-3. *Int Immunopharmacol*, 2005. 5(4): p. 735-47.
271. Bischoff, S.C. and C.A. Dahinden, Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. *Blood*, 1992. 79(10): p. 2662-9.
272. Burgi, B., et al., Basophil priming by neurotrophic factors. Activation through the trk receptor. *J Immunol*, 1996. 157(12): p. 5582-8.
273. Sin, A.Z., et al., Nerve growth factor or IL-3 induces more IL-13 production from basophils of allergic subjects than from basophils of nonallergic subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. 108(3): p. 387-93.
274. Heinemann, A., et al., A novel assay to measure the calcium flux in human basophils: effects of chemokines and nerve growth factor. *Pharmacology*, 2003. 67(1): p. 49-54.
275. Carraway, R. and S.E. Leeman, The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J Biol Chem*, 1973. 248(19): p. 6854-61.
276. Carraway, R. and S.E. Leeman, The synthesis of neurotensin. *J Biol Chem*, 1975. 250(5): p. 1912-8.
277. Marondel, I., et al., Physical mapping of the human neurotensin gene (NTS) between markers D12S1444 and D12S81 on chromosome 12q21. *Genomics*, 1996. 38(2): p. 243-5.
278. Minamino, N., K. Kangawa, and H. Matsuo, Neuromedin N: a novel neurotensin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984. 122(2): p. 542-9.
279. Bean, A.J., et al., Cloning of human neurotensin/neuromedin N genomic sequences and expression in the ventral mesencephalon of schizophrenics and age/sex matched controls. *Neuroscience*, 1992. 50(2): p. 259-68.
280. Dobner, P.R., et al., Cloning and sequence analysis of cDNA for the canine neurotensin/neuromedin N precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(10): p. 3516-20.
281. Kislauskis, E., et al., The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression, and evolution of exon sequences. *J Biol Chem*, 1988. 263(10): p. 4963-8.
282. Carraway, R., S.E. Ruane, and H.R. Kim, Distribution and immunochemical character of neurotensin-like material in representative vertebrates and invertebrates: apparent conservation of the COOH-terminal region during evolution. *Peptides*, 1982. 3(2): p. 115-23.
283. Rostene, W.H. and M.J. Alexander, Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol*, 1997. 18(2): p. 115-73.

284. Kitabgi, P., Neurotensin and neuromedin N are differentially processed from a common precursor by prohormone convertases in tissues and cell lines. *Results Probl Cell Differ*, 2010. 50: p. 85-96.
285. Ernst, A., S. Hellmich, and A. Bergmann, Proneurotensin 1-117, a stable neurotensin precursor fragment identified in human circulation. *Peptides*, 2006. 27(7): p. 1787-93.
286. Rovere, C., P. Barbero, and P. Kitabgi, Evidence that PC2 is the endogenous pro-neurotensin convertase in rMTC 6-23 cells and that PC1- and PC2-transfected PC12 cells differentially process pro-neurotensin. *J Biol Chem*, 1996. 271(19): p. 11368-75.
287. Mitra, S.P., et al., Canine neurotensin, neurotensin6-13 and neuromedin N: primary structures and receptor activity. *Regul Pept*, 1990. 28(1): p. 11-22.
288. Carraway, R.E. and S.P. Mitra, Potential precursors to neuromedin N in the cat and their processing by pepsin. *Endocrinology*, 1987. 120(5): p. 2101-7.
289. Kitabgi, P., et al., Biosynthesis, maturation, release, and degradation of neurotensin and neuromedin N. *Ann N Y Acad Sci*, 1992. 668: p. 30-42.
290. Carraway, R.E., S.P. Mitra, and T.J. Joyce, Tissue-specific processing of neurotensin/neuromedin-N precursor in cat. *Regul Pept*, 1993. 43(1-2): p. 97-106.
291. Carraway, R.E., S.P. Mitra, and C. Paradise, Characterization of large neuromedin-N using antisera towards regions of the neurotensin/neuromedin-N precursor. *Peptides*, 1991. 12(3): p. 601-7.
292. Vincent, J.P., J. Mazella, and P. Kitabgi, Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 1999. 20(7): p. 302-9.
293. Rosell, S. and A. Rokaeus, The effect of ingestion of amino acids, glucose and fat on circulating neurotensin-like immunoreactivity (NTLI) in man. *Acta Physiol Scand*, 1979. 107(3): p. 263-67.
294. Shennan, K.I. and M.C. Sheppard, Neurotensin release from rat hypothalamus in vitro. *J Endocrinol*, 1983. 97(1): p. 105-11.
295. Vincent, J.P., Neurotensin receptors: binding properties, transduction pathways, and structure. *Cell Mol Neurobiol*, 1995. 15(5): p. 501-12.
296. Gullo, L., et al., Plasma cholecystokinin and neurotensin after an ordinary meal in humans. A prolonged time study. *Gastroenterol Clin Biol*, 1998. 22(1): p. 25-8.
297. Kitabgi, P., et al., Calcium-dependent release of neuromedin N and neurotensin from mouse hypothalamus. *Neuropeptides*, 1990. 15(2): p. 111-4.
298. Bean, A.J., M.J. During, and R.H. Roth, Stimulation-induced release of coexistent transmitters in the prefrontal cortex: an in vivo microdialysis study of dopamine and neurotensin release. *J Neurochem*, 1989. 53(2): p. 655-7.
299. Eriste, E., et al., A novel form of neurotensin post-translationally modified by arginylation. *J Biol Chem*, 2005. 280(42): p. 35089-97.
300. Reinecke, M., Neurotensin. Immunohistochemical localization in central and peripheral nervous system and in endocrine cells and its functional role as neurotransmitter and endocrine hormone. *Prog Histochem Cytochem*, 1985. 16(1): p. 1-172.
301. Uhl, G.R., M.J. Kuhar, and S.H. Snyder, Neurotensin: immunohistochemical localization in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. 74(9): p. 4059-63.
302. Uhl, G.R. and S.H. Snyder, Neurotensin receptor binding, regional and subcellular distributions favor transmitter role. *Eur J Pharmacol*, 1977. 41(1): p. 89-91.
303. Dobner, P.R., Multitasking with neurotensin in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*, 2005. 62(17): p. 1946-63.
304. DiFiglia, M., N. Aronin, and S.E. Leeman, Ultrastructural localization of immunoreactive neurotensin in the monkey superficial dorsal horn. *J Comp Neurol*, 1984. 225(1): p. 1-12.
305. Kitabgi, P., et al., Functional and pharmacological aspects of central neuropeptidergic transmission mediated by neurotensin and neuromedin n. *Clin Neuropharmacol*, 1992. 15 Suppl 1 Pt A: p. 313A-314A.

306. Cooper, P.E., et al., The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. *Brain Res*, 1981. 218(1-2): p. 219-32.
307. Manberg, P.J., et al., Regional distribution of neurotensin in human brain. *J Neurochem*, 1982. 38(6): p. 1777-80.
308. Dobner, P.R., Neurotensin and pain modulation. *Peptides*, 2006. 27(10): p. 2405-14.
309. Carraway, R. and S.E. Leeman, Characterization of radioimmunoassayable neurotensin in the rat. Its differential distribution in the central nervous system, small intestine, and stomach. *J Biol Chem*, 1976. 251(22): p. 7045-52.
310. McCann, S.M. and E. Vijayan, Control of anterior pituitary hormone secretion by neurotensin. *Ann N Y Acad Sci*, 1992. 668: p. 287-97.
311. Gearing, M. and E. Terasawa, The alpha-1-adrenergic neuronal system is involved in the pulsatile release of luteinizing hormone-releasing hormone in the ovariectomized female rhesus monkey. *Neuroendocrinology*, 1991. 53(4): p. 373-81.
312. Hara, Y., et al., Ontogeny of the neurotensin-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis. I. Forebrain and diencephalon. *J Comp Neurol*, 1982. 208(2): p. 177-95.
313. Minagawa, H., et al., Ontogeny of neurotensin-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis--II. Lower brain stem. *Neuroscience*, 1983. 8(3): p. 467-86.
314. Zahm, D.S., et al., Postnatal development of striatal neurotensin immunoreactivity in relation to clusters of substance P immunoreactive neurons and the "dopamine islands" in the rat. *J Comp Neurol*, 1990. 296(3): p. 403-14.
315. Clineschmidt, B.V. and J.C. McGuffin, Neurotensin administered intracisternally inhibits responsiveness of mice to noxious stimuli. *Eur J Pharmacol*, 1977. 46(4): p. 395-6.
316. Clineschmidt, B.V., J.C. McGuffin, and P.B. Bunting, Neurotensin: antinocisponsive action in rodents. *Eur J Pharmacol*, 1979. 54(1-2): p. 129-39.
317. Nemeroff, C.B., et al., Alterations in nociception and body temperature after intracisternal administration of neurotensin, beta-endorphin, other endogenous peptides, and morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. 76(10): p. 5368-71.
318. Smith, K.E., et al., NTS1 and NTS2 mediate analgesia following neurotensin analog treatment in a mouse model for visceral pain. *Behav Brain Res*, 2012. 232(1): p. 93-7.
319. Clineschmidt, B.V., G.E. Martin, and D.F. Veber, Antinocisponsive effects of neurotensin and neurotensin-related peptides. *Ann N Y Acad Sci*, 1982. 400: p. 283-306.
320. Kalivas, P.W., et al., Neurotensin: topographical distribution of brain sites involved in hypothermia and antinociception. *J Comp Neurol*, 1982. 210(3): p. 225-38.
321. Mora, F., T.F. Lee, and R.D. Myers, Is neurotensin in the brain involved in thermoregulation of the monkey? *Peptides*, 1984. 5(1): p. 125-8.
322. Kandasamy, S.B., W.A. Hunt, and A.H. Harris, Role of neurotensin in radiation-induced hypothermia in rats. *Radiat Res*, 1991. 126(2): p. 218-22.
323. Benmoussa, M., et al., Low doses of neurotensin in the preoptic area produce hyperthermia. Comparison with other brain sites and with neurotensin-induced analgesia. *Brain Res Bull*, 1996. 39(5): p. 275-9.
324. Bean, A.J., et al., Dopamine and neurotensin storage in colocalized and noncolocalized neuronal populations. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989. 249(3): p. 681-7.
325. Lapchak, P.A., et al., Neurotensin regulation of endogenous acetylcholine release from rat cerebral cortex: effect of quinolinic acid lesions of the basal forebrain. *J Neurochem*, 1990. 55(4): p. 1397-403.
326. Lapchak, P.A., et al., Neurotensin regulation of endogenous acetylcholine release from rat striatal slices is independent of dopaminergic tone. *J Neurochem*, 1991. 56(2): p. 651-7.
327. Quirion, R., et al., Distribution of neurotensin receptors in mammalian brain. What it is telling us about its interactions with other neurotransmitter systems. *Ann N Y Acad Sci*, 1992. 668: p. 109-19.

328. Petkova-Kirova, P., et al., Neurotensin modulation of acetylcholine, GABA, and aspartate release from rat prefrontal cortex studied in vivo with microdialysis. *Brain Res Bull*, 2008. 77(2-3): p. 129-35.
329. Myers, R.D. and T.F. Lee, In vivo release of dopamine during perfusion of neurotensin in substantia nigra of the unrestrained rat. *Peptides*, 1983. 4(6): p. 955-61.
330. Kost, N.V., et al., Neurotensin-Like Peptides as Potential Antipsychotics: Modulation of the Serotonin System. *Bull Exp Biol Med*, 2014.
331. Prus, A.J., et al., The neurotensin analog NT69L enhances medial prefrontal cortical dopamine and acetylcholine efflux: potentiation of risperidone-, but not haloperidol-, induced dopamine efflux. *Brain Res*, 2007. 1184: p. 354-64.
332. Ferraro, L., et al., The striatal neurotensin receptor modulates striatal and pallidal glutamate and GABA release: functional evidence for a pallidal glutamate-GABA interaction via the pallidal-subthalamic nucleus loop. *J Neurosci*, 1998. 18(17): p. 6977-89.
333. Li, S., J.D. Geiger, and S. Lei, Neurotensin enhances GABAergic activity in rat hippocampus CA1 region by modulating L-type calcium channels. *J Neurophysiol*, 2008. 99(5): p. 2134-43.
334. Ferraro, L., et al., Neurotensin increases endogenous glutamate release in rat cortical slices. *Life Sci*, 2000. 66(10): p. 927-36.
335. Ferraro, L., et al., Neurotensin receptors as modulators of glutamatergic transmission. *Brain Res Rev*, 2008. 58(2): p. 365-73.
336. Kempadoo, K.A., et al., Hypothalamic neurotensin projections promote reward by enhancing glutamate transmission in the VTA. *J Neurosci*, 2013. 33(18): p. 7618-26.
337. Caceda, R., B. Kinkead, and C.B. Nemeroff, Neurotensin: role in psychiatric and neurological diseases. *Peptides*, 2006. 27(10): p. 2385-404.
338. St-Gelais, F., C. Jomphe, and L.E. Trudeau, The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *J Psychiatry Neurosci*, 2006. 31(4): p. 229-45.
339. Dobner, P.R., et al., Neurotensin-deficient mice show altered responses to antipsychotic drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(14): p. 8048-53.
340. Senba, E., et al., Ontogeny of the peptidergic system in the rat spinal cord: immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol*, 1982. 208(1): p. 54-66.
341. Kitabgi, P., Neurotensin modulates dopamine neurotransmission at several levels along brain dopaminergic pathways. *Neurochem Int*, 1989. 14(2): p. 111-9.
342. Berseth, C.L., et al., Responses of gastrointestinal peptides and motor activity to milk and water feedings in preterm and term infants. *Pediatr Res*, 1992. 31(6): p. 587-90.
343. Linard, C., et al., Changes in gut neurotensin and modified colonic motility following whole-body irradiation in rat. *Int J Radiat Biol*, 1997. 71(5): p. 581-8.
344. Kalafatakis, K. and K. Triantafyllou, Contribution of neurotensin in the immune and neuroendocrine modulation of normal and abnormal enteric function. *Regul Pept*, 2011. 170(1-3): p. 7-17.
345. Sundler, F., et al., Immunohistochemical localization of neurotensin in endocrine cells of the gut. *Cell Tissue Res*, 1977. 178(3): p. 313-21.
346. Sundler, F., et al., Ultrastructure of the gut neurotensin cell. *Histochemistry*, 1977. 53(1): p. 25-34.
347. Muraki, K., et al., Ontogenic development of neurotensin-like immunoreactivity in the gastrointestinal tract and the influence of dietary changes in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1987. 6(2): p. 290-5.
348. Mustain, W.C., P.G. Rychahou, and B.M. Evers, The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2011. 18(1): p. 75-82.
349. Kitabgi, P., R. Carraway, and S.E. Leeman, Isolation of a tridecapeptide from bovine intestinal tissue and its partial characterization as neurotensin. *J Biol Chem*, 1976. 251(22): p. 7053-8.
350. Wood, J.G., et al., Neurotensin stimulates growth of small intestine in rats. *Am J Physiol*, 1988. 255(6 Pt 1): p. G813-7.

351. DeGolier, T.F., et al., Neurotensin modulates the composition of pancreatic exocrine secretions in chickens. *J Exp Zool*, 1999. 283(4-5): p. 455-62.
352. Hoang, H.D., et al., Interaction of neurotensin with caerulein or secretin on digestive tract growth in rats. *Regul Pept*, 1988. 22(3): p. 275-84.
353. Gui, X., P.R. Dobner, and R.E. Carraway, Endogenous neurotensin facilitates enterohepatic bile acid circulation by enhancing intestinal uptake in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. 281(6): p. G1413-22.
354. Gui, X. and R.E. Carraway, Enhancement of jejunal absorption of conjugated bile acid by neurotensin in rats. *Gastroenterology*, 2001. 120(1): p. 151-60.
355. Gui, X. and R.E. Carraway, Involvement of mast cells in basal and neurotensin-induced intestinal absorption of taurocholate in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. 287(2): p. G408-16.
356. Checler, F., et al., Neurotensin metabolism in various tissues of central and peripheral origins: ubiquitous involvement of a novel neurotensin degrading metalloendopeptidase. *Biochimie*, 1988. 70(1): p. 75-82.
357. Chabry, J., et al., Colocalization of neurotensin receptors and of the neurotensin-degrading enzyme endopeptidase 24-16 in primary cultures of neurons. *J Neurosci*, 1990. 10(12): p. 3916-21.
358. Zsurgor, N., et al., Ontogenesis and binding properties of high-affinity neurotensin receptors in human brain. *Brain Res*, 1992. 586(2): p. 303-10.
359. Terenghi, G., et al., Neurotensin-like immunoreactivity in a subpopulation of noradrenaline-containing cells of the cat adrenal gland. *Endocrinology*, 1983. 112(1): p. 226-33.
360. Tsuto, T., et al., Immunohistochemical investigations of gut hormones in the colon of patients with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*, 1985. 20(3): p. 266-70.
361. Goedert, M., et al., Inverse relationship between neurotensin receptors and neurotensin-like immunoreactivity in cat striatum. *Nature*, 1984. 307(5951): p. 543-6.
362. Kitabgi, P., et al., Two populations of neurotensin binding sites in murine brain: discrimination by the antihistamine levocabastine reveals markedly different radioautographic distribution. *Eur J Pharmacol*, 1987. 140(3): p. 285-93.
363. Sadoul, J.L., et al., Loss of high affinity neurotensin receptors in substantia nigra from parkinsonian subjects. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984. 125(1): p. 395-404.
364. Mazella, J., et al., Monoiodo-[Trp11]neurotensin, a highly radioactive ligand of neurotensin receptors. Preparation, biological activity, and binding properties to rat brain synaptic membranes. *J Biol Chem*, 1983. 258(6): p. 3476-81.
365. Kitabgi, P., et al., Pharmacology and biochemistry of neurotensin receptors. *Rev Clin Basic Pharm*, 1985. 5(3-4): p. 397-486.
366. Myers, R.M., et al., Cancer, chemistry, and the cell: molecules that interact with the neurotensin receptors. *ACS Chem Biol*, 2009. 4(7): p. 503-25.
367. Mazella, J., et al., The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, 1998. 273(41): p. 26273-6.
368. Marcusson, E.G., et al., The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell*, 1994. 77(4): p. 579-86.
369. Hassan, A.J., et al., The trafficking of prosaposin (SGP-1) and GM2AP to the lysosomes of TM4 Sertoli cells is mediated by sortilin and monomeric adaptor proteins. *Mol Reprod Dev*, 2004. 68(4): p. 476-83.
370. Tanaka, K., M. Masu, and S. Nakanishi, Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron*, 1990. 4(6): p. 847-54.
371. Maeno, H., et al., Cloning and characterization of the rat neurotensin receptor gene promoter. *Brain Res Mol Brain Res*, 1996. 40(1): p. 97-104.
372. Vita, N., et al., Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. *FEBS Lett*, 1993. 317(1-2): p. 139-42.

373. Botto, J.M., et al., Identification in the rat neurotensin receptor of amino-acid residues critical for the binding of neurotensin. *Brain Res Mol Brain Res*, 1997. 46(1-2): p. 311-7.
374. Labbe-Jullie, C., et al., Mutagenesis and modeling of the neurotensin receptor NTR1. Identification of residues that are critical for binding SR 48692, a nonpeptide neurotensin antagonist. *J Biol Chem*, 1998. 273(26): p. 16351-7.
375. Barroso, S., et al., Identification of residues involved in neurotensin binding and modeling of the agonist binding site in neurotensin receptor 1. *J Biol Chem*, 2000. 275(1): p. 328-36.
376. Pang, Y.P., et al., Proposed ligand binding site of the transmembrane receptor for neurotensin(8-13). *J Biol Chem*, 1996. 271(25): p. 15060-8.
377. Richard, F., et al., Impaired G protein coupling of the neurotensin receptor 1 by mutations in extracellular loop 3. *Eur J Pharmacol*, 2001. 433(1): p. 63-71.
378. Kitabgi, P., Functional domains of the subtype 1 neurotensin receptor (NTS1). *Peptides*, 2006. 27(10): p. 2461-8.
379. Boudin, H., et al., Immunological recognition of different forms of the neurotensin receptor in transfected cells and rat brain. *Biochem J*, 1995. 305 (Pt 1): p. 277-83.
380. Boudin, H., et al., Immunologic differentiation of two high-affinity neurotensin receptor isoforms in the developing rat brain. *J Comp Neurol*, 2000. 425(1): p. 45-57.
381. Heakal, Y., et al., Neurotensin receptor-1 inducible palmitoylation is required for efficient receptor-mediated mitogenic-signaling within structured membrane microdomains. *Cancer Biol Ther*, 2011. 12(5): p. 427-35.
382. Sato, M., H. Kiyama, and M. Tohyama, Different postnatal development of cells expressing mRNA encoding neurotensin receptor. *Neuroscience*, 1992. 48(1): p. 137-49.
383. Palacios, J.M., et al., The ontogeny of brain neurotensin receptors studied by autoradiography. *Neuroscience*, 1988. 25(1): p. 307-17.
384. Hermans, E., et al., Postnatal ontogeny of the rat brain neurotensin receptor mRNA. *Neurosci Lett*, 1993. 157(1): p. 45-8.
385. Sadoul, J.L., et al., Characterization and visualization of neurotensin binding to receptor sites in human brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984. 120(1): p. 206-13.
386. Sarrieau, A., et al., Characterization and autoradiographic distribution of neurotensin binding sites in the human brain. *Brain Res*, 1985. 348(2): p. 375-80.
387. Wolf, S.S., et al., Autoradiographic characterization of 125I-neurotensin binding sites in human entorhinal cortex. *Brain Res Bull*, 1994. 35(4): p. 353-8.
388. Evers, B.M., et al., Temporal-specific and spatial-specific patterns of neurotensin gene expression in the small bowel. *Am J Physiol*, 1994. 267(5 Pt 1): p. G875-82.
389. Seybold, V.S., et al., Neurotensin binding sites in porcine jejunum: biochemical characterization and intramural localization. *Synapse*, 1990. 6(1): p. 81-90.
390. Mendez, M., et al., High affinity neurotensin receptor mRNA distribution in rat brain and peripheral tissues. Analysis by quantitative RT-PCR. *J Mol Neurosci*, 1997. 9(2): p. 93-102.
391. Huidobro-Toro, J.P. and A. Kullak, Excitatory neurotensin receptors on the smooth muscle of the rat fundus: possible implications in gastric motility. *Br J Pharmacol*, 1985. 84(4): p. 897-910.
392. Wang, L., et al., Neurotensin receptor-1 mRNA analysis in normal pancreas and pancreatic disease. *Clin Cancer Res*, 2000. 6(2): p. 566-71.
393. Ehrenfried, J.A., et al., Expression of the neurotensin gene in fetal human liver and fibrolamellar carcinoma. *Ann Surg*, 1994. 220(4): p. 484-9; discussion 489-91.
394. Almeida, T.A., et al., Differential expression of new splice variants of the neurotensin receptor 1 gene in human prostate cancer cell lines. *Peptides*, 2010. 31(2): p. 242-7.
395. Rodriguez, Y., et al., Neurotensin and neurotensin receptor 1 expression in human myometrium and uterine leiomyomas. *Biol Reprod*, 2010. 83(4): p. 641-7.
396. Mazella, J., et al., Neurotensin and its receptors in the control of glucose homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012. 3: p. 143.

397. Porzionato, A., et al., Neurotensin receptor 1 immunoreactivity in the peripheral ganglia and carotid body. *Eur J Histochem*, 2009. 53(3): p. 135-42.
398. Fassio, A., et al., Distribution of the neurotensin receptor NTS1 in the rat CNS studied using an amino-terminal directed antibody. *Neuropharmacology*, 2000. 39(8): p. 1430-42.
399. Opland, D., et al., Loss of neurotensin receptor-1 disrupts the control of the mesolimbic dopamine system by leptin and promotes hedonic feeding and obesity. *Mol Metab*, 2013. 2(4): p. 423-34.
400. Pettibone, D.J., et al., The effects of deleting the mouse neurotensin receptor NTR1 on central and peripheral responses to neurotensin. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. 300(1): p. 305-13.
401. Scarceriaux, V., et al., Neurotensin receptor down-regulation induced by dexamethasone and forskolin in rat hypothalamic cultures is mediated by endogenous neurotensin. *J Neuroendocrinol*, 1996. 8(8): p. 587-93.
402. Lepee-Lorgeoux, I., et al., Regulation of the neurotensin NT(1) receptor in the developing rat brain following chronic treatment with the antagonist SR 48692. *J Neurosci Res*, 2000. 60(3): p. 362-9.
403. Azzi, M., et al., In vivo regulation of neurotensin receptors following long-term pharmacological blockade with a specific receptor antagonist. *Brain Res Mol Brain Res*, 1996. 42(2): p. 213-21.
404. Yamada, M., et al., Regulation of neurotensin receptor mRNA expression by the receptor antagonist SR 48692 in the rat midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res Mol Brain Res*, 1995. 33(2): p. 343-6.
405. Souzaze, F., W. Rostene, and P. Forgez, Neurotensin agonist induces differential regulation of neurotensin receptor mRNA. Identification of distinct transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem*, 1997. 272(15): p. 10087-94.
406. Najimi, M., et al., Activation of receptor gene transcription is required to maintain cell sensitization after agonist exposure. Study on neurotensin receptor. *J Biol Chem*, 1998. 273(34): p. 21634-41.
407. Donato di Paola, E., et al., Desensitization and down-regulation of neurotensin receptors in murine neuroblastoma clone N1E-115 by [D-Lys8] neurotensin(8-13). *J Pharmacol Exp Ther*, 1993. 264(1): p. 1-5.
408. Yamada, M., M. Yamada, and E. Richelson, Role of signal transduction systems in neurotensin receptor down-regulation induced by agonist in murine neuroblastoma clone N1E-115 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993. 267(1): p. 128-33.
409. Yamada, M., M. Yamada, and E. Richelson, Further characterization of neurotensin receptor desensitization and down-regulation in clone N1E-115 neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol*, 1993. 45(10): p. 2149-54.
410. Mitra, S.P. and R.E. Carraway, High affinity binding of 125I-neurotensin to dispersed cells from chicken liver and brain. *Peptides*, 1997. 18(4): p. 521-5.
411. Gully, D., et al., Biochemical and pharmacological activities of SR 142948A, a new potent neurotensin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997. 280(2): p. 802-12.
412. Betancur, C., et al., Characterization of binding sites of a new neurotensin receptor antagonist, [3H]SR 142948A, in the rat brain. *Eur J Pharmacol*, 1998. 343(1): p. 67-77.
413. Botto, J.M., et al., Effects of SR 48692 on neurotensin-induced calcium-activated chloride currents in the *Xenopus* oocyte expression system: agonist-like activity on the levocabastine-sensitive neurotensin receptor and absence of antagonist effect on the levocabastine insensitive neurotensin receptor. *Neurosci Lett*, 1997. 223(3): p. 193-6.
414. Labbe-Jullie, C., et al., [3H]SR 48692, the first nonpeptide neurotensin antagonist radioligand: characterization of binding properties and evidence for distinct agonist and antagonist binding domains on the rat neurotensin receptor. *Mol Pharmacol*, 1995. 47(5): p. 1050-6.

415. Steinberg, R., et al., SR 48692, a non-peptide neurotensin receptor antagonist differentially affects neurotensin-induced behaviour and changes in dopaminergic transmission. *Neuroscience*, 1994. 59(4): p. 921-9.
416. Chartoff, E.H., et al., Endogenous neurotensin attenuates dopamine-dependent locomotion and stereotypy. *Brain Res*, 2004. 1022(1-2): p. 71-80.
417. Dubuc, I., et al., Tolerance to the hypothermic but not to the analgesic effect of [D-Trp11]neurotensin during the semichronic intracerebroventricular infusion of the peptide in rats. *Peptides*, 1994. 15(2): p. 303-7.
418. Kreitel, K.D., C.B. Swisher, and M.M. Behbehani, The effects of diphenhydramine and SR142948A on periaqueductal gray neurons and on the interactions between the medial preoptic nucleus and the periaqueductal gray. *Neuroscience*, 2002. 114(4): p. 935-43.
419. Baxendale, I.R., et al., The synthesis of neurotensin antagonist SR 48692 for prostate cancer research. *Bioorg Med Chem*, 2013. 21(14): p. 4378-87.
420. Yamada, M., et al., Deletion mutation in the putative third intracellular loop of the rat neurotensin receptor abolishes polyphosphoinositide hydrolysis but not cyclic AMP formation in CHO-K1 cells. *Mol Pharmacol*, 1994. 46(3): p. 470-6.
421. Martin, S., et al., Pivotal role of an aspartate residue in sodium sensitivity and coupling to G proteins of neurotensin receptors. *Mol Pharmacol*, 1999. 55(2): p. 210-5.
422. Najimi, M., J.M. Maloteaux, and E. Hermans, Cytoskeleton-related trafficking of the EAAC1 glutamate transporter after activation of the G(q/11)-coupled neurotensin receptor NTS1. *FEBS Lett*, 2002. 523(1-3): p. 224-8.
423. Turner, J.T., M.R. James-Kracke, and J.M. Camden, Regulation of the neurotensin receptor and intracellular calcium mobilization in HT29 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990. 253(3): p. 1049-56.
424. Snider, R.M., et al., Neurotensin stimulates inositol phospholipid metabolism and calcium mobilization in murine neuroblastoma clone N1E-115. *J Neurochem*, 1986. 47(4): p. 1214-8.
425. Gailly, P., M. Najimi, and E. Hermans, Evidence for the dual coupling of the rat neurotensin receptor with pertussis toxin-sensitive and insensitive G-proteins. *FEBS Lett*, 2000. 483(2-3): p. 109-13.
426. Seufferlein, T. and E. Rozengurt, Galanin, neurotensin, and phorbol esters rapidly stimulate activation of mitogen-activated protein kinase in small cell lung cancer cells. *Cancer Res*, 1996. 56(24): p. 5758-64.
427. Ehlers, R.A., et al., Neurotensin-mediated activation of MAPK pathways and AP-1 binding in the human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 269(3): p. 704-8.
428. Poinot-Chazel, C., et al., Activation of mitogen-activated protein kinase couples neurotensin receptor stimulation to induction of the primary response gene Krox-24. *Biochem J*, 1996. 320 (Pt 1): p. 145-51.
429. Kim, H.S., et al., Neurotensin enhances nitric oxide generation via the JAK2-STAT1 pathway in murine macrophage Raw264.7 cells during costimulation with LPS and IFN γ . *Neuropeptides*, 2006. 40(3): p. 221-9.
430. Najimi, M., et al., Neurotensin induces tyrosine hydroxylase gene activation through nitric oxide and protein kinase C signaling pathways. *Mol Pharmacol*, 2002. 62(3): p. 647-53.
431. Dupouy, S., et al., The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. *Biochimie*, 2011. 93(9): p. 1369-78.
432. Calebiro, D., et al., Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 2010. 31(5): p. 221-8.
433. Savdie, C., et al., Cell-type-specific pathways of neurotensin endocytosis. *Cell Tissue Res*, 2006. 324(1): p. 69-85.

434. Chabry, J., et al., Thr-422 and Tyr-424 residues in the carboxyl terminus are critical for the internalization of the rat neurotensin receptor. *J Biol Chem*, 1995. 270(6): p. 2439-42.
435. Mazella, J., et al., Binding and internalization of iodinated neurotensin in neuronal cultures from embryonic mouse brain. *Brain Res*, 1991. 564(2): p. 249-55.
436. Beaudet, A., et al., Internalization and intracellular mobilization of neurotensin in neuronal cells. *Biochem Pharmacol*, 1994. 47(1): p. 43-52.
437. Vandenbulcke, F., et al., Ligand-induced internalization of neurotensin in transfected COS-7 cells: differential intracellular trafficking of ligand and receptor. *J Cell Sci*, 2000. 113 (Pt 17): p. 2963-75.
438. Faure, M.P., D. Nouel, and A. Beaudet, Axonal and dendritic transport of internalized neurotensin in rat mesostriatal dopaminergic neurons. *Neuroscience*, 1995. 68(2): p. 519-29.
439. Faure, M.P., et al., Binding and internalization of neurotensin in hybrid cells derived from septal cholinergic neurons. *Synapse*, 1995. 20(2): p. 106-16.
440. Law, I.K., et al., Neurotensin-induced proinflammatory signaling in human colonocytes is regulated by beta-arrestins and endothelin-converting enzyme-1-dependent endocytosis and resensitization of neurotensin receptor 1. *J Biol Chem*, 2012. 287(18): p. 15066-75.
441. Bohm, S.K., E.F. Grady, and N.W. Bunnett, Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J*, 1997. 322 (Pt 1): p. 1-18.
442. Ferguson, S.S., Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, 2001. 53(1): p. 1-24.
443. Chabry, J., et al., Stable expression of the cloned rat brain neurotensin receptor into fibroblasts: binding properties, photoaffinity labeling, transduction mechanisms, and internalization. *J Neurochem*, 1994. 63(1): p. 19-27.
444. Martin, S., et al., Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology*, 2002. 123(4): p. 1135-43.
445. Hermans, E. and J.M. Maloteaux, Mechanisms of regulation of neurotensin receptors. *Pharmacol Ther*, 1998. 79(2): p. 89-104.
446. Mazella, J., et al., Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J Neurosci*, 1996. 16(18): p. 5613-20.
447. Chalon, P., et al., Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS Lett*, 1996. 386(2-3): p. 91-4.
448. Vita, N., et al., Neurotensin is an antagonist of the human neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Pharmacol*, 1998. 360(2-3): p. 265-72.
449. Ceresa, B.P. and L.E. Limbird, Mutation of an aspartate residue highly conserved among G-protein-coupled receptors results in nonreciprocal disruption of alpha 2-adrenergic receptor-G-protein interactions. A negative charge at amino acid residue 79 forecasts alpha 2A-adrenergic receptor sensitivity to allosteric modulation by monovalent cations and fully effective receptor/G-protein coupling. *J Biol Chem*, 1994. 269(47): p. 29557-64.
450. Botto, J.M., et al., Identification and expression of a variant isoform of the levocabastine-sensitive neurotensin receptor in the mouse central nervous system. *FEBS Lett*, 1997. 400(2): p. 211-4.
451. Perron, A., et al., Identification and functional characterization of a 5-transmembrane domain variant isoform of the NTS2 neurotensin receptor in rat central nervous system. *J Biol Chem*, 2005. 280(11): p. 10219-27.
452. Sun, Y.J., et al., Mouse neurotensin receptor 2 gene (*Ntsr2*): genomic organization, transcriptional regulation and genetic mapping on chromosome 12. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001. 95(1-2): p. 167-71.
453. Sarret, P., et al., Pharmacology and functional properties of NTS2 neurotensin receptors in cerebellar granule cells. *J Biol Chem*, 2002. 277(39): p. 36233-43.

454. Nouel, D., et al., Pharmacological, molecular and functional characterization of glial neurotensin receptors. *Neuroscience*, 1999. 94(4): p. 1189-97.
455. Yamada, M., et al., Distinct functional characteristics of levocabastine sensitive rat neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Life Sci*, 1998. 62(23): p. PL 375-80.
456. Schotte, A., J.E. Leysen, and P.M. Laduron, Evidence for a displaceable non-specific [3H]neurotensin binding site in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1986. 333(4): p. 400-5.
457. Asselin, M.L., et al., Localization of neurotensin NTS2 receptors in rat brain, using. *Neuroreport*, 2001. 12(5): p. 1087-91.
458. Sarret, P., et al., Immunohistochemical distribution of NTS2 neurotensin receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 2003. 461(4): p. 520-38.
459. Pang, Y., Z. Cai, and P.G. Rhodes, Analysis of genes differentially expressed in astrocytes stimulated with lipopolysaccharide using cDNA arrays. *Brain Res*, 2001. 914(1-2): p. 15-22.
460. Schulz, S., et al., Immunocytochemical identification of low-affinity NTS2 neurotensin receptors in parietal cells of human gastric mucosa. *J Endocrinol*, 2006. 191(1): p. 121-8.
461. Kitabgi, P., et al., Characterization of neurotensin binding to rat gastric smooth muscle receptor sites. *Peptides*, 1984. 5(5): p. 917-23.
462. Ahmad, S. and E.E. Daniel, Receptors for neurotensin in canine small intestine. *Peptides*, 1991. 12(3): p. 623-9.
463. Coppola, T., et al., Neurotensin protects pancreatic beta cells from apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. 40(10): p. 2296-302.
464. Beraud-Dufour, S., et al., Neurotensin receptor-2 and -3 are crucial for the anti-apoptotic effect of neurotensin on pancreatic beta-TC3 cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. 41(12): p. 2398-402.
465. Mistry, A. and E. Vijayan, Neurotensin enhances estradiol induced DNA synthesis in immature rat uterus. *Life Sci*, 1985. 36(21): p. 2063-7.
466. Pettibone, D.J. and J.A. Totaro, High affinity binding of [3H]neurotensin of rat uterus. *Peptides*, 1987. 8(6): p. 1169-72.
467. Quirion, R., et al., Localization of neurotensin binding sites in rat kidney. *Peptides*, 1982. 3(5): p. 765-9.
468. Roussy, G., et al., Evidence for a role of NTS2 receptors in the modulation of tonic pain sensitivity. *Mol Pain*, 2009. 5: p. 38.
469. Lafrance, M., et al., Involvement of NTS2 receptors in stress-induced analgesia. *Neuroscience*, 2010. 166(2): p. 639-52.
470. Dubuc, I., et al., Identification of the receptor subtype involved in the analgesic effect of neurotensin. *J Neurosci*, 1999. 19(1): p. 503-10.
471. Dubuc, I., S. Remande, and J. Costentin, The partial agonist properties of levocabastine in neurotensin-induced analgesia. *Eur J Pharmacol*, 1999. 381(1): p. 9-12.
472. Yamauchi, R., et al., Antinociception induced by beta-lactotensin, a neurotensin agonist peptide derived from beta-lactoglobulin, is mediated by NT2 and D1 receptors. *Life Sci*, 2003. 73(15): p. 1917-23.
473. Maeno, H., et al., Comparison of mice deficient in the high- or low-affinity neurotensin receptors, Ntsr1 or Ntsr2, reveals a novel function for Ntsr2 in thermal nociception. *Brain Res*, 2004. 998(1): p. 122-9.
474. Yamauchi, R., et al., Neurotensin type 2 receptor is involved in fear memory in mice. *J Neurochem*, 2007. 102(5): p. 1669-76.
475. Richard, F., et al., Agonism, inverse agonism, and neutral antagonism at the constitutively active human neurotensin receptor 2. *Mol Pharmacol*, 2001. 60(6): p. 1392-8.

476. Gendron, L., et al., Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling: internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Mol Pharmacol*, 2004. 66(6): p. 1421-30.
477. Debaigt, C., et al., Crucial role of neuron-enriched endosomal protein of 21 kDa in sorting between degradation and recycling of internalized G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 2004. 279(34): p. 35687-91.
478. Botto, J.M., et al., Stable expression of the mouse levocabastine-sensitive neurotensin receptor in HEK 293 cell line: binding properties, photoaffinity labeling, and internalization mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 243(2): p. 585-90.
479. Martin, S., J.P. Vincent, and J. Mazella, Recycling ability of the mouse and the human neurotensin type 2 receptors depends on a single tyrosine residue. *J Cell Sci*, 2002. 115(Pt 1): p. 165-73.
480. Zsurger, N., J. Mazella, and J.P. Vincent, Solubilization and purification of a high affinity neurotensin receptor from newborn human brain. *Brain Res*, 1994. 639(2): p. 245-52.
481. Jacobsen, L., et al., Molecular characterization of a novel human hybrid-type receptor that binds the alpha2-macroglobulin receptor-associated protein. *J Biol Chem*, 1996. 271(49): p. 31379-83.
482. Yamazaki, H., et al., Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member. *J Biol Chem*, 1996. 271(40): p. 24761-8.
483. Hermey, G., et al., Identification and characterization of SorCS, a third member of a novel receptor family. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 266(2): p. 347-51.
484. Sarret, P., et al., Distribution of NTS3 receptor/sortilin mRNA and protein in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 2003. 461(4): p. 483-505.
485. Battey, F.D., et al., The 39-kDa receptor-associated protein regulates ligand binding by the very low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*, 1994. 269(37): p. 23268-73.
486. Gliemann, J., et al., The multiligand alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein (alpha 2MR/LRP). Binding and endocytosis of fluid phase and membrane-associated ligands. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. 737: p. 20-38.
487. Rourke, I.J., et al., Heterologous expression of human cholecystokinin in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a lysine-specific endopeptidase in the yeast secretory pathway. *J Biol Chem*, 1997. 272(15): p. 9720-7.
488. Mazella, J., Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal*, 2001. 13(1): p. 1-6.
489. Wilson, C.M., et al., The implications of sortilin/vps10p domain receptors in neurological and human diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2014. 13(8): p. 1354-65.
490. Munck Petersen, C., et al., Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J*, 1999. 18(3): p. 595-604.
491. Mazella, J., et al., Spadin, a sortilin-derived peptide, targeting rodent TREK-1 channels: a new concept in the antidepressant drug design. *PLoS Biol*, 2010. 8(4): p. e1000355.
492. Moha Ou Maati, H., et al., The peptidic antidepressant spadin interacts with prefrontal 5-HT and mGluR receptors in the control of serotonergic function. *Brain Struct Funct*, 2014.
493. Veyssiere, J., et al., Retroinverso analogs of spadin display increased antidepressant effects. *Psychopharmacology (Berl)*, 2014.
494. Johnson, K.F. and S. Kornfeld, A His-Leu-Leu sequence near the carboxyl terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function. *J Biol Chem*, 1992. 267(24): p. 17110-5.
495. Johnson, K.F. and S. Kornfeld, The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi. *J Cell Biol*, 1992. 119(2): p. 249-57.

496. Hermey, G., et al., Tumour necrosis factor alpha-converting enzyme mediates ectodomain shedding of Vps10p-domain receptor family members. *Biochem J*, 2006. 395(2): p. 285-93.
497. Nyborg, A.C., et al., Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates. *Mol Neurodegener*, 2006. 1: p. 3.
498. Evans, S.F., et al., Neuronal brain-derived neurotrophic factor is synthesized in excess, with levels regulated by sortilin-mediated trafficking and lysosomal degradation. *J Biol Chem*, 2011. 286(34): p. 29556-67.
499. Evans, J.A. and A. Rzhetsky, Advancing science through mining libraries, ontologies, and communities. *J Biol Chem*, 2011. 286(27): p. 23659-66.
500. Finan, G.M., H. Okada, and T.W. Kim, BACE1 retrograde trafficking is uniquely regulated by the cytoplasmic domain of sortilin. *J Biol Chem*, 2011. 286(14): p. 12602-16.
501. Paiardini, A. and V. Caputo, Insights into the interaction of sortilin with proneurotrophins: a computational approach. *Neuropeptides*, 2008. 42(2): p. 205-14.
502. Dal Farra, C., et al., Involvement of the neurotensin receptor subtype NTR3 in the growth effect of neurotensin on cancer cell lines. *Int J Cancer*, 2001. 92(4): p. 503-9.
503. Martin, S., J.P. Vincent, and J. Mazella, Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia. *J Neurosci*, 2003. 23(4): p. 1198-205.
504. Chabry, J., et al., Implication of various forms of neurotensin receptors in the mechanism of internalization of neurotensin in cerebral neurons. *J Biol Chem*, 1993. 268(23): p. 17138-44.
505. Hutson, L.D. and M. Bothwell, Expression and function of *Xenopus laevis* p75(NTR) suggest evolution of developmental regulatory mechanisms. *J Neurobiol*, 2001. 49(2): p. 79-98.
506. Kanning, K.C., et al., Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci*, 2003. 23(13): p. 5425-36.
507. Murray, S.S., et al., A novel p75 neurotrophin receptor-related protein, NRH2, regulates nerve growth factor binding to the TrkA receptor. *J Neurosci*, 2004. 24(11): p. 2742-9.
508. Kim, T. and B.L. Hempstead, NRH2 is a trafficking switch to regulate sortilin localization and permit proneurotrophin-induced cell death. *EMBO J*, 2009. 28(11): p. 1612-23.
509. Lin, B.Z., P.F. Pilch, and K.V. Kandror, Sortilin is a major protein component of Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem*, 1997. 272(39): p. 24145-7.
510. Ariga, M., et al., Functional role of sortilin in myogenesis and development of insulin-responsive glucose transport system in C2C12 myocytes. *J Biol Chem*, 2008. 283(15): p. 10208-20.
511. Nielsen, M.S., et al., Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase. *J Biol Chem*, 1999. 274(13): p. 8832-6.
512. Lefrancois, S., et al., Inactivation of sortilin (a novel lysosomal sorting receptor) by dominant negative competition and RNA interference. *Biol Proced Online*, 2005. 7: p. 17-25.
513. Bogan, J.S., Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. *Annu Rev Biochem*, 2012. 81: p. 507-32.
514. Coutinho, M.F., et al., Sortilin and the risk of cardiovascular disease. *Rev Port Cardiol*, 2013. 32(10): p. 793-9.
515. Moore, T.C., Modification of lymphocyte traffic by vasoactive neurotransmitter substances. *Immunology*, 1984. 52(3): p. 511-8.
516. Garrido, J.J., et al., Modulation by neurotensin and neuromedin N of adherence and chemotaxis capacity of murine lymphocytes. *Regul Pept*, 1992. 41(1): p. 27-37.
517. Evers, B.M., et al., Characterization of functional neurotensin receptors on human lymphocytes. *Surgery*, 1994. 116(2): p. 134-9; discussion 139-40.
518. Soder, O. and P.M. Hellstrom, Neuropeptide regulation of human thymocyte, guinea pig T lymphocyte and rat B lymphocyte mitogenesis. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1987. 84(2): p. 205-11.

519. Ramez, M., et al., Functional characterization of neurotensin receptors in human cutaneous T cell lymphoma malignant lymphocytes. *J Invest Dermatol*, 2001. 117(3): p. 687-93.
520. Magazin, M., et al., Sezary syndrome cells unlike normal circulating T lymphocytes fail to migrate following engagement of NT1 receptor. *J Invest Dermatol*, 2004. 122(1): p. 111-8.
521. Cochrane, D.E., et al., HMC-1 human mast cells synthesize neurotensin (NT) precursor, secrete bioactive NT-like peptide(s) and express NT receptor NTS1. *Inflamm Res*, 2011. 60(12): p. 1139-51.
522. Atoji, Y., Y. Yamamoto, and Y. Suzuki, Neurotensin-containing endocrine cells and neurotensin receptor mRNA-expressing epithelial cells in the chicken thymus. *Arch Histol Cytol*, 1996. 59(2): p. 197-203.
523. Carraway, R. and Y.M. Bhatnagar, Immunochemical characterization of neurotensin-like peptides in chicken. *Peptides*, 1980. 1(2): p. 159-65.
524. Mignini, F., et al., Neuropeptides of human thymus in normal and pathological conditions. *Peptides*, 2011. 32(5): p. 920-8.
525. Vanneste, Y., et al., Identification of neurotensin-related peptides in human thymic epithelial cell membranes and relationship with major histocompatibility complex class I molecules. *J Neuroimmunol*, 1997. 76(1-2): p. 161-6.
526. Zhao, D., et al., Insulin-like growth factor-1 receptor transactivation modulates the inflammatory and proliferative responses of neurotensin in human colonic epithelial cells. *J Biol Chem*, 2011. 286(8): p. 6092-9.
527. Zhao, D., et al., Neurotensin stimulates IL-8 expression in human colonic epithelial cells through Rho GTPase-mediated NF-kappa B pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. 284(6): p. C1397-404.
528. Sgourakis, G., et al., The combined use of serum neurotensin and IL-8 as screening markers for colorectal cancer. *Tumour Biol*, 2014. 35(6): p. 5993-6002.
529. Olszewski, U. and G. Hamilton, Neurotensin signaling induces intracellular alkalinization and interleukin-8 expression in human pancreatic cancer cells. *Mol Oncol*, 2009. 3(3): p. 204-13.
530. Koon, H.W., et al., Neurotensin induces IL-6 secretion in mouse preadipocytes and adipose tissues during 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(21): p. 8766-71.
531. Selbekk, B.H., O. Flaten, and L.E. Hanssen, The in vitro effect of neurotensin on human jejunal mast cells. *Scand J Gastroenterol*, 1980. 15(4): p. 457-60.
532. Vasiadi, M., et al., Neurotensin serum levels and skin gene expression are increased in atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, 2013. 169(3): p. 695-9.
533. Alysandratos, K.D., et al., Neurotensin and CRH interactions augment human mast cell activation. *PLoS One*, 2012. 7(11): p. e48934.
534. da Silva, L., et al., Neurotensin downregulates the pro-inflammatory properties of skin dendritic cells and increases epidermal growth factor expression. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1813(10): p. 1863-71.
535. De la Fuente, M., et al., Stimulation of phagocytic function in mouse macrophages by neurotensin and neuromedin N. *J Neuroimmunol*, 1993. 42(1): p. 97-104.
536. Goldman, R., Z. Bar-Shavit, and D. Romeo, Neurotensin modulates human neutrophil locomotion and phagocytic capability. *FEBS Lett*, 1983. 159(1-2): p. 63-7.
537. Dicou, E., J.P. Vincent, and J. Mazella, Neurotensin receptor-3/sortilin mediates neurotensin-induced cytokine/chemokine expression in a murine microglial cell line. *J Neurosci Res*, 2004. 78(1): p. 92-9.
538. Martin, S., et al., Neurotensin and the neurotensin receptor-3 in microglial cells. *J Neurosci Res*, 2005. 81(3): p. 322-6.
539. Gutierrez, M.G., et al., NF-kappa B activation controls phagolysosome fusion-mediated killing of mycobacteria by macrophages. *J Immunol*, 2008. 181(4): p. 2651-63.

540. Wahe, A., et al., Golgi-to-phagosome transport of acid sphingomyelinase and prosaposin is mediated by sortilin. *J Cell Sci*, 2010. 123(Pt 14): p. 2502-11.
541. Campagnolo, L., et al., Sortilin expression is essential for pro-nerve growth factor-induced apoptosis of rat vascular smooth muscle cells. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e84969.
542. Mortensen, M.B., et al., Targeting sortilin in immune cells reduces proinflammatory cytokines and atherosclerosis. *J Clin Invest*, 2014. 124(12): p. 5317-22.
543. Patel, K.M., et al., Macrophage Sortilin Promotes LDL Uptake, Foam Cell Formation, and Atherosclerosis. *Circ Res*, 2015.
544. Herda, S., et al., The sorting receptor Sortilin exhibits a dual function in exocytic trafficking of interferon-gamma and granzyme A in T cells. *Immunity*, 2012. 37(5): p. 854-66.
545. Silver, J.S. and C.A. Hunter, gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol*, 2010. 88(6): p. 1145-56.
546. Larsen, J.V., et al., Sortilin facilitates signaling of ciliary neurotrophic factor and related helical type 1 cytokines targeting the gp130/leukemia inhibitory factor receptor beta heterodimer. *Mol Cell Biol*, 2010. 30(17): p. 4175-87.
547. Ly, K., et al., Neurotrophins are expressed in giant-cell arteritis lesions and may contribute to vascular remodeling. *Arthritis Res Ther*, 2014. 16(6): p. 487.
548. Gutniak, M., et al., Report on a patient with watery diarrhoea syndrome caused by a pancreatic tumour containing neurotensin, enkephalin and calcitonin. *Acta Med Scand*, 1980. 208(1-2): p. 95-100.
549. Zeytinoglu, F.N., et al., Characterization of neurotensin production by a line of rat medullary thyroid carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. 77(6): p. 3741-5.
550. Zeytinoglu, F.N., et al., Clonal strains of rat medullary thyroid carcinoma cells that produce neurotensin and calcitonin. Functional and morphologic studies. *Lab Invest*, 1983. 49(4): p. 453-9.
551. Ljungberg, O., et al., A compound follicular-parafollicular cell carcinoma of the thyroid: a new tumor entity? *Cancer*, 1983. 52(6): p. 1053-61.
552. Evers, B.M., et al., Fetal and neoplastic expression of the neurotensin gene in the human colon. *Ann Surg*, 1996. 223(5): p. 464-70; discussion 470-1.
553. Ulich, T.R., et al., A colonic adenocarcinoma with argentaffin cells. An immunoperoxidase study demonstrating the presence of numerous neuroendocrine products. *Cancer*, 1983. 51(8): p. 1483-9.
554. Yoshinaga, K., et al., Neurotensin stimulates growth of colon cancer. *Surg Oncol*, 1992. 1(2): p. 127-34.
555. Iwase, K., et al., Indirect inhibitory effect of a neurotensin receptor antagonist on human colon cancer (LoVo) growth. *Surg Oncol*, 1996. 5(5-6): p. 245-51.
556. Moody, T.W., et al., Neurotensin is produced by and secreted from classic small cell lung cancer cells. *Life Sci*, 1985. 36(18): p. 1727-32.
557. Davis, T.P., et al., Beta-endorphin and neurotensin stimulate in vitro clonal growth of human SCLC cells. *Eur J Pharmacol*, 1989. 161(2-3): p. 283-5.
558. Herbst, W.M., et al., Carcinoid tumors of the thymus. An immunohistochemical study. *Cancer*, 1987. 60(10): p. 2465-70.
559. Kwee, H.G., Fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Am Fam Physician*, 1989. 40(2): p. 175-7.
560. Moody, T.W., et al., Neurotensin is metabolized by endogenous proteases in prostate cancer cell lines. *Peptides*, 1998. 19(2): p. 253-8.
561. Sehgal, I., et al., Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen withdrawal in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(11): p. 4673-7.
562. Evers, B.M., Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues. *Peptides*, 2006. 27(10): p. 2424-33.
563. Przedborski, S., M. Levivier, and J.L. Cadet, Neurotensin receptors in human meningiomas. *Ann Neurol*, 1991. 30(5): p. 650-4.

564. Souza, F., et al., Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer Res*, 2006. 66(12): p. 6243-9.
565. Iwase, K., et al., Inhibition of neurotensin-induced pancreatic carcinoma growth by a nonpeptide neurotensin receptor antagonist, SR48692. *Cancer*, 1997. 79(9): p. 1787-93.
566. Maoret, J.J., et al., Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice. *Int J Cancer*, 1999. 80(3): p. 448-54.
567. Gully, D., et al., Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(1): p. 65-9.
568. Moody, T.W., et al., SR48692 is a neurotensin receptor antagonist which inhibits the growth of small cell lung cancer cells. *Peptides*, 2001. 22(1): p. 109-15.
569. Dong, Z., et al., DNA methylation contributes to expression of the human neurotensin/neuromedin N gene. *Am J Physiol*, 1998. 274(3 Pt 1): p. G535-43.
570. Evers, B.M., et al., Neurotensin stimulates growth of colonic mucosa in young and aged rats. *Gastroenterology*, 1992. 103(1): p. 86-91.
571. Bugni, J.M., et al., The neurotensin receptor-1 promotes tumor development in a sporadic but not an inflammation-associated mouse model of colon cancer. *Int J Cancer*, 2012. 130(8): p. 1798-805.
572. Bakirtzi, K., et al., Neurotensin signaling activates microRNAs-21 and -155 and Akt, promotes tumor growth in mice, and is increased in human colon tumors. *Gastroenterology*, 2011. 141(5): p. 1749-61 e1.
573. Gui, X., et al., Neurotensin receptor 1 overexpression in inflammatory bowel diseases and colitis-associated neoplasia. *World J Gastroenterol*, 2013. 19(28): p. 4504-10.
574. Gui, X., et al., Increased neurotensin receptor-1 expression during progression of colonic adenocarcinoma. *Peptides*, 2008. 29(9): p. 1609-15.
575. Souza, F. and P. Forgez, Molecular and cellular regulation of neurotensin receptor under acute and chronic agonist stimulation. *Peptides*, 2006. 27(10): p. 2493-501.
576. Wang, X., et al., Curcumin inhibits neurotensin-mediated interleukin-8 production and migration of HCT116 human colon cancer cells. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(18): p. 5346-55.
577. Alifano, M., et al., Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2010. 16(17): p. 4401-10.
578. Swift, S.L., J.E. Burns, and N.J. Maitland, Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer. *Cancer Res*, 2010. 70(1): p. 347-56.
579. Somai, S., et al., Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 295(2): p. 482-8.
580. Dupouy, S., et al., The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. *PLoS One*, 2009. 4(1): p. e4223.
581. Wang, J.G., et al., Pancreatic cancer bears overexpression of neurotensin and neurotensin receptor subtype-1 and SR 48692 counteracts neurotensin induced cell proliferation in human pancreatic ductal carcinoma cell line PANC-1. *Neuropeptides*, 2011. 45(2): p. 151-6.
582. Ryder, N.M., et al., G protein-coupled receptor signaling in human ductal pancreatic cancer cells: neurotensin responsiveness and mitogenic stimulation. *J Cell Physiol*, 2001. 186(1): p. 53-64.
583. Guha, S., O. Rey, and E. Rozengurt, Neurotensin induces protein kinase C-dependent protein kinase D activation and DNA synthesis in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. *Cancer Res*, 2002. 62(6): p. 1632-40.
584. Guha, S., et al., Neurotensin stimulates protein kinase C-dependent mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. *Cancer Res*, 2003. 63(10): p. 2379-87.

585. Kisfalvi, K., et al., Metformin disrupts crosstalk between G protein-coupled receptor and insulin receptor signaling systems and inhibits pancreatic cancer growth. *Cancer Res*, 2009. 69(16): p. 6539-45.
586. Buchegger, F., et al., Radiolabeled neurotensin analog, ^{99m}Tc-NT-XI, evaluated in ductal pancreatic adenocarcinoma patients. *J Nucl Med*, 2003. 44(10): p. 1649-54.
587. Reubi, J.C., et al., Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenocarcinoma. *Gut*, 1998. 42(4): p. 546-50.
588. Valentino, J.D., et al., Cotargeting the PI3K and RAS pathways for the treatment of neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res*, 2014. 20(5): p. 1212-22.
589. Amorino, G.P., P.D. Deeble, and S.J. Parsons, Neurotensin stimulates mitogenesis of prostate cancer cells through a novel c-Src/Stat5b pathway. *Oncogene*, 2007. 26(5): p. 745-56.
590. Valerie, N.C., et al., Inhibition of neurotensin receptor 1 selectively sensitizes prostate cancer to ionizing radiation. *Cancer Res*, 2011. 71(21): p. 6817-26.
591. Atala, A., Re: Inhibition of neurotensin receptor 1 selectively sensitizes prostate cancer to ionizing radiation. *J Urol*, 2012. 188(1): p. 326-7.
592. Seethalakshmi, L., et al., Neurotensin receptor expression in prostate cancer cell line and growth effect of NT at physiological concentrations. *Prostate*, 1997. 31(3): p. 183-92.
593. Sethi, T. and E. Rozengurt, Multiple neuropeptides stimulate clonal growth of small cell lung cancer: effects of bradykinin, vasopressin, cholecystokinin, galanin, and neurotensin. *Cancer Res*, 1991. 51(13): p. 3621-3.
594. Sethi, T., et al., Growth of small cell lung cancer cells: stimulation by multiple neuropeptides and inhibition by broad spectrum antagonists in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 1992. 52(9 Suppl): p. 2737s-2742s.
595. Younes, M., et al., Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib. *Oncotarget*, 2014. 5(18): p. 8252-69.
596. Moody, T.W., et al., Neuropeptides as autocrine growth factors in cancer cells. *Curr Pharm Des*, 2003. 9(6): p. 495-509.
597. Leyton, J., et al., Neurotensin causes tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in lung cancer cells. *Eur J Pharmacol*, 2002. 442(3): p. 179-86.
598. Alifano, M., et al., Neurotensin expression and outcome of malignant pleural mesothelioma. *Biochimie*, 2010. 92(2): p. 164-70.
599. Haase, C., et al., Neurotensin receptors in adeno- and squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, 2006. 26(5A): p. 3527-33.
600. Perron, A., et al., NTS2 modulates the intracellular distribution and trafficking of NTS1 via heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 353(3): p. 582-90.
601. Hwang, J.R., et al., Intermolecular cross-talk between NTR1 and NTR2 neurotensin receptor promotes intracellular sequestration and functional inhibition of NTR1 receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. 391(1): p. 1007-13.
602. Giorgi, R.R., et al., Expression of neurotensin and its receptors in pituitary adenomas. *J Neuroendocrinol*, 2008. 20(9): p. 1052-7.
603. Akil, H., et al., Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival. *PLoS One*, 2011. 6(9): p. e25097.
604. Xiong, J., et al., ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells in vitro. *Neuro Oncol*, 2013. 15(8): p. 990-1007.
605. Demont, Y., et al., Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein. *J Biol Chem*, 2012. 287(3): p. 1923-31.
606. Dhanasekaran, N., L.E. Heasley, and G.L. Johnson, G protein-coupled receptor systems involved in cell growth and oncogenesis. *Endocr Rev*, 1995. 16(3): p. 259-70.

607. Pyne, N.J. and S. Pyne, Receptor tyrosine kinase-G-protein-coupled receptor signalling platforms: out of the shadow? *Trends Pharmacol Sci*, 2011. 32(8): p. 443-50.
608. Luttrell, L.M., Y. Daaka, and R.J. Lefkowitz, Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 1999. 11(2): p. 177-83.
609. Cattaneo, F., et al., Cell-surface receptors transactivation mediated by g protein-coupled receptors. *Int J Mol Sci*, 2014. 15(11): p. 19700-28.
610. Daub, H., et al., Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 1996. 379(6565): p. 557-60.
611. Asakura, M., et al., Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med*, 2002. 8(1): p. 35-40.
612. George, A.J., R.D. Hannan, and W.G. Thomas, Unravelling the molecular complexity of GPCR-mediated EGFR transactivation using functional genomics approaches. *FEBS J*, 2013. 280(21): p. 5258-68.
613. Massa, F., et al., Neurotensin-induced Erk1/2 phosphorylation and growth of human colonic cancer cells are independent from growth factors receptors activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. 414(1): p. 118-22.
614. Rajagopal, R., et al., Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes. *J Neurosci*, 2004. 24(30): p. 6650-8.
615. Muller, K.M., et al., Role of protein kinase C and epidermal growth factor receptor signalling in growth stimulation by neurotensin in colon carcinoma cells. *BMC Cancer*, 2011. 11: p. 421.
616. Dupouy, S., et al., Activation of EGFR, HER2 and HER3 by neurotensin/neurotensin receptor 1 renders breast tumors aggressive yet highly responsive to lapatinib and metformin in mice. *Oncotarget*, 2014. 5(18): p. 8235-51.
617. Moody, T.W., et al., SR48692 inhibits non-small cell lung cancer proliferation in an EGF receptor-dependent manner. *Life Sci*, 2014. 100(1): p. 25-34.
618. Lee, F.S. and M.V. Chao, Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(6): p. 3555-60.
619. Wiese, S., et al., Adenosine receptor A2A-R contributes to motoneuron survival by transactivating the tyrosine kinase receptor TrkB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(43): p. 17210-5.
620. Rajagopal, R. and M.V. Chao, A role for Fyn in Trk receptor transactivation by G-protein-coupled receptor signaling. *Mol Cell Neurosci*, 2006. 33(1): p. 36-46.
621. Conway, A.M., et al., Platelet-derived-growth-factor stimulation of the p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway in airway smooth muscle: role of pertussis-toxin-sensitive G-proteins, c-Src tyrosine kinases and phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J*, 1999. 337 (Pt 2): p. 171-7.
622. Alderton, F., et al., Tethering of the platelet-derived growth factor beta receptor to G-protein-coupled receptors. A novel platform for integrative signaling by these receptor classes in mammalian cells. *J Biol Chem*, 2001. 276(30): p. 28578-85.
623. Rakhit, S., S. Pyne, and N.J. Pyne, The platelet-derived growth factor receptor stimulation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase in airway smooth muscle involves a G-protein-mediated tyrosine phosphorylation of Gab1. *Mol Pharmacol*, 2000. 58(2): p. 413-20.
624. Waters, C., et al., Sphingosine 1-phosphate and platelet-derived growth factor (PDGF) act via PDGF beta receptor-sphingosine 1-phosphate receptor complexes in airway smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 2003. 278(8): p. 6282-90.
625. Long, J.S., et al., The functional PDGFbeta receptor-S1P1 receptor signaling complex is involved in regulating migration of mouse embryonic fibroblasts in response to platelet derived growth factor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2006. 80(1-2): p. 74-80.
626. Waters, C.M., et al., c-Src is involved in regulating signal transmission from PDGFbeta receptor-GPCR(s) complexes in mammalian cells. *Cell Signal*, 2005. 17(2): p. 263-77.

627. Zhang, J., et al., Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem*, 1996. 271(31): p. 18302-5.
628. Daub, H., et al., Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J*, 1997. 16(23): p. 7032-44.
629. Luttrell, D.K. and L.M. Luttrell, Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases. *Oncogene*, 2004. 23(48): p. 7969-78.
630. Moughal, N.A., et al., Nerve growth factor signaling involves interaction between the Trk A receptor and lysophosphatidate receptor 1 systems: nuclear translocation of the lysophosphatidate receptor 1 and Trk A receptors in pheochromocytoma 12 cells. *Cell Signal*, 2004. 16(1): p. 127-36.
631. Moughal, N.A., et al., Protean agonism of the lysophosphatidic acid receptor-1 with Ki16425 reduces nerve growth factor-induced neurite outgrowth in pheochromocytoma 12 cells. *J Neurochem*, 2006. 98(6): p. 1920-9.
632. Taylor, D.D., S. Akyol, and C. Gercel-Taylor, Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. *J Immunol*, 2006. 176(3): p. 1534-42.
633. Caby, M.P., et al., Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*, 2005. 17(7): p. 879-87.
634. Sabapatha, A., C. Gercel-Taylor, and D.D. Taylor, Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am J Reprod Immunol*, 2006. 56(5-6): p. 345-55.
635. Admyre, C., et al., Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *Eur Respir J*, 2003. 22(4): p. 578-83.
636. Sharma, S., et al., Structural-mechanical characterization of nanoparticle exosomes in human saliva, using correlative AFM, FESEM, and force spectroscopy. *ACS Nano*, 2010. 4(4): p. 1921-6.
637. Palanisamy, V., et al., Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PLoS One*, 2010. 5(1): p. e8577.
638. Fernandez-Llama, P., et al., Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int*, 2010. 77(8): p. 736-42.
639. Gonzales, P.A., et al., Isolation and purification of exosomes in urine. *Methods Mol Biol*, 2010. 641: p. 89-99.
640. Admyre, C., et al., Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol*, 2007. 179(3): p. 1969-78.
641. Gatti, J.L., et al., Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles. *Biol Reprod*, 2005. 72(6): p. 1452-65.
642. Andre, F., et al., Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*, 2002. 360(9329): p. 295-305.
643. Taylor, D.D. and C. Gercel-Taylor, Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *Br J Cancer*, 2005. 92(2): p. 305-11.
644. Trams, E.G., et al., Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 1981. 645(1): p. 63-70.
645. Harding, C., J. Heuser, and P. Stahl, Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*, 1983. 97(2): p. 329-39.
646. Pan, B.T., et al., Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*, 1985. 101(3): p. 942-8.
647. Klumperman, J. and G. Raposo, The complex ultrastructure of the endolysosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014. 6(10): p. a016857.
648. Gould, G.W. and J. Lippincott-Schwartz, New roles for endosomes: from vesicular carriers to multi-purpose platforms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. 10(4): p. 287-92.
649. Stoorvogel, W., et al., Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell*, 1991. 65(3): p. 417-27.

650. Jaiswal, J.K., N.W. Andrews, and S.M. Simon, Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *J Cell Biol*, 2002. 159(4): p. 625-35.
651. Raposo, G., et al., B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, 1996. 183(3): p. 1161-72.
652. Mathivanan, S. and R.J. Simpson, ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics*, 2009. 9(21): p. 4997-5000.
653. Hanson, P.I. and A. Cashikar, Multivesicular body morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012. 28: p. 337-62.
654. Mathivanan, S., H. Ji, and R.J. Simpson, Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*, 2010. 73(10): p. 1907-20.
655. Witwer, K.W., et al., Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*, 2013. 2.
656. Thery, C., M. Ostrowski, and E. Segura, Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(8): p. 581-93.
657. Thery, C., et al., Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006. Chapter 3: p. Unit 3 22.
658. Coppieters, K., et al., No significant CTL cross-priming by dendritic cell-derived exosomes during murine lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol*, 2009. 182(4): p. 2213-20.
659. Subra, C., et al., Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*, 2007. 89(2): p. 205-12.
660. Colombo, M., G. Raposo, and C. Thery, Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014. 30: p. 255-89.
661. Williams, R.L. and S. Urbe, The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8(5): p. 355-68.
662. Buschow, S.I., et al., Exosomes contain ubiquitinated proteins. *Blood Cells Mol Dis*, 2005. 35(3): p. 398-403.
663. Hurley, J.H. and G. Odorizzi, Get on the exosome bus with ALIX. *Nat Cell Biol*, 2012. 14(7): p. 654-5.
664. Schmidt, O. and D. Teis, The ESCRT machinery. *Curr Biol*, 2012. 22(4): p. R116-20.
665. Hurley, J.H., The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2010. 45(6): p. 463-87.
666. Cashikar, A.G., et al., Structure of cellular ESCRT-III spirals and their relationship to HIV budding. *Elife*, 2014. 3.
667. Bache, K.G., et al., Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol*, 2003. 162(3): p. 435-42.
668. Katzmann, D.J., et al., Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol*, 2003. 162(3): p. 413-23.
669. Kostelansky, M.S., et al., Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell*, 2007. 129(3): p. 485-98.
670. Weissenhorn, W. and H. Gottlinger, ESCRT-I part II: forming the real ESCRT-I complex. *Cell Host Microbe*, 2007. 2(1): p. 1-2.
671. Stefani, F., et al., UBAP1 is a component of an endosome-specific ESCRT-I complex that is essential for MVB sorting. *Curr Biol*, 2011. 21(14): p. 1245-50.
672. Teo, H., et al., ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Dev Cell*, 2004. 7(4): p. 559-69.
673. Hurley, J.H. and P.I. Hanson, Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. 11(8): p. 556-66.
674. Teis, D., et al., ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *EMBO J*, 2010. 29(5): p. 871-83.

675. Teo, H., D.B. Veprintsev, and R.L. Williams, Structural insights into endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) recognition of ubiquitinated proteins. *J Biol Chem*, 2004. 279(27): p. 28689-96.
676. Babst, M., et al., Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell*, 2002. 3(2): p. 271-82.
677. Babst, M., et al., Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell*, 2002. 3(2): p. 283-9.
678. Stuchell-Brereton, M.D., et al., ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature*, 2007. 449(7163): p. 740-4.
679. Kieffer, C., et al., Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding. *Dev Cell*, 2008. 15(1): p. 62-73.
680. Obita, T., et al., Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature*, 2007. 449(7163): p. 735-9.
681. Hill, C.P. and M. Babst, Structure and function of the membrane deformation AAA ATPase Vps4. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1823(1): p. 172-81.
682. van Niel, G., et al., The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell*, 2011. 21(4): p. 708-21.
683. Buschow, S.I., et al., MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic*, 2009. 10(10): p. 1528-42.
684. Chairoungdua, A., et al., Exosome release of beta-catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol*, 2010. 190(6): p. 1079-91.
685. Petersen, S.H., et al., The role of tetraspanin CD63 in antigen presentation via MHC class II. *Eur J Immunol*, 2011. 41(9): p. 2556-61.
686. Trajkovic, K., et al., Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 2008. 319(5867): p. 1244-7.
687. Phuyal, S., et al., Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. *FEBS J*, 2014. 281(9): p. 2214-27.
688. Ratajczak, J., et al., Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 2006. 20(5): p. 847-56.
689. Hong, B.S., et al., Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics*, 2009. 10: p. 556.
690. Chiba, M., M. Kimura, and S. Asari, Exosomes secreted from human colorectal cancer cell lines contain mRNAs, microRNAs and natural antisense RNAs, that can transfer into the human hepatoma HepG2 and lung cancer A549 cell lines. *Oncol Rep*, 2012. 28(5): p. 1551-8.
691. Kosaka, N., et al., Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*, 2010. 285(23): p. 17442-52.
692. Valadi, H., et al., Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007. 9(6): p. 654-9.
693. Skog, J., et al., Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*, 2008. 10(12): p. 1470-6.
694. Hessvik, N.P., et al., Profiling of microRNAs in exosomes released from PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1819(11-12): p. 1154-63.
695. Irion, U. and D. St Johnston, bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex. *Nature*, 2007. 445(7127): p. 554-8.
696. Muntasell, A., A.C. Berger, and P.A. Roche, T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes. *EMBO J*, 2007. 26(19): p. 4263-72.
697. Vidal, M., P. Mangeat, and D. Hoekstra, Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *J Cell Sci*, 1997. 110 (Pt 16): p. 1867-77.

698. Shen, B., et al., Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors. *J Biol Chem*, 2011. 286(16): p. 14383-95.
699. Lobito, A.A., et al., Abnormal disulfide-linked oligomerization results in ER retention and altered signaling by TNFR1 mutants in TNFR1-associated periodic fever syndrome (TRAPS). *Blood*, 2006. 108(4): p. 1320-7.
700. Bobrie, A., et al., Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*, 2011. 12(12): p. 1659-68.
701. Viaud, S., et al., Exosomes for the treatment of human malignancies. *Horm Metab Res*, 2008. 40(2): p. 82-8.
702. Zitvogel, L., et al., Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med*, 1998. 4(5): p. 594-600.
703. Taieb, J., N. Chaput, and L. Zitvogel, Dendritic cell-derived exosomes as cell-free peptide-based vaccines. *Crit Rev Immunol*, 2005. 25(3): p. 215-23.
704. Pitt, J.M., et al., Dendritic cell-derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer. *J Immunol*, 2014. 193(3): p. 1006-11.
705. Chaput, N., et al., The potential of exosomes in immunotherapy of cancer. *Blood Cells Mol Dis*, 2005. 35(2): p. 111-5.
706. Viaud, S., et al., Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next? *Cancer Res*, 2010. 70(4): p. 1281-5.
707. Putz, U., et al., PTEN secretion in exosomes. *Methods*, 2014.
708. Putz, U., et al., The tumor suppressor PTEN is exported in exosomes and has phosphatase activity in recipient cells. *Sci Signal*, 2012. 5(243): p. ra70.
709. Canitano, A., et al., Exosomes released in vitro from Epstein-Barr virus (EBV)-infected cells contain EBV-encoded latent phase mRNAs. *Cancer Lett*, 2013. 337(2): p. 193-9.
710. Meckes, D.G., Jr., et al., Modulation of B-cell exosome proteins by gamma herpesvirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(31): p. E2925-33.
711. Al-Nedawi, K., B. Meehan, and J. Rak, Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. *Cell Cycle*, 2009. 8(13): p. 2014-8.
712. Al-Nedawi, K., et al., Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*, 2008. 10(5): p. 619-24.
713. Al-Nedawi, K., et al., Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(10): p. 3794-9.
714. Wilson, C.M., et al., Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *J Cell Sci*, 2014. 127(Pt 18): p. 3983-97.
715. Saleem, S.N. and A.B. Abdel-Mageed, Tumor-derived exosomes in oncogenic reprogramming and cancer progression. *Cell Mol Life Sci*, 2015. 72(1): p. 1-10.
716. Demory Beckler, M., et al., Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Mol Cell Proteomics*, 2013. 12(2): p. 343-55.
717. D'Asti, E., et al., Oncogenic extracellular vesicles in brain tumor progression. *Front Physiol*, 2012. 3: p. 294.
718. Qu, J.L., et al., Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. *Dig Liver Dis*, 2009. 41(12): p. 875-80.
719. Pegtel, D.M., et al., Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(14): p. 6328-33.
720. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(4): p. 259-69.
721. Aung, T., et al., Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(37): p. 15336-41.

722. Rubin, J., M.A. Flynn, and K.D. Nolph, Total body potassium--a guide to nutritional health in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Clin Nutr*, 1981. 34(1): p. 94-8.
723. Wetzker, R. and F.D. Bohmer, Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(8): p. 651-7.
724. Werry, T.D., P.M. Sexton, and A. Christopoulos, "Ins and outs" of seven-transmembrane receptor signalling to ERK. *Trends Endocrinol Metab*, 2005. 16(1): p. 26-33.
725. Delcourt, N., J. Bockaert, and P. Marin, GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation. *Trends Pharmacol Sci*, 2007. 28(12): p. 602-7.
726. Gilmour, A.M., et al., A novel epidermal growth factor receptor-signaling platform and its targeted translation in pancreatic cancer. *Cell Signal*, 2013. 25(12): p. 2587-603.
727. Fischer, O.M., et al., Reactive oxygen species mediate Met receptor transactivation by G protein-coupled receptors and the epidermal growth factor receptor in human carcinoma cells. *J Biol Chem*, 2004. 279(28): p. 28970-8.
728. Thomas, W.G., et al., Adenoviral-directed expression of the type 1A angiotensin receptor promotes cardiomyocyte hypertrophy via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Circ Res*, 2002. 90(2): p. 135-42.
729. Itoh, Y., et al., IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine*, 2005. 29(6): p. 275-82.
730. Frank, G.D., et al., N-acetylcysteine inhibits angiotensin ii-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase and epidermal growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 280(4): p. 1116-9.
731. Moody, T.W., et al., EGFR Transactivation by Peptide G Protein-Coupled Receptors in Cancer. *Curr Drug Targets*, 2015.
732. Cattaneo, F., M. Parisi, and R. Ammendola, WKYMVm-induced cross-talk between FPR2 and HGF receptor in human prostate epithelial cell line PNT1A. *FEBS Lett*, 2013. 587(10): p. 1536-42.
733. Kruk, J.S., et al., Reactive oxygen species are required for 5-HT-induced transactivation of neuronal platelet-derived growth factor and TrkB receptors, but not for ERK1/2 activation. *PLoS One*, 2013. 8(9): p. e77027.
734. Bergelin, N., et al., S1P1 and VEGFR-2 form a signaling complex with extracellularly regulated kinase 1/2 and protein kinase C-alpha regulating ML-1 thyroid carcinoma cell migration. *Endocrinology*, 2010. 151(7): p. 2994-3005.
735. Hobson, J.P., et al., Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science*, 2001. 291(5509): p. 1800-3.
736. Akekawatchai, C., et al., Transactivation of CXCR4 by the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in human MDA-MB-231 breast cancer epithelial cells. *J Biol Chem*, 2005. 280(48): p. 39701-8.
737. Toman, R.E., et al., Differential transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors modulates NGF-induced neurite extension. *J Cell Biol*, 2004. 166(3): p. 381-92.
738. Mira, E., et al., A role for chemokine receptor transactivation in growth factor signaling. *EMBO Rep*, 2001. 2(2): p. 151-6.
739. Delcourt, N., et al., PACAP type I receptor transactivation is essential for IGF-1 receptor signalling and antiapoptotic activity in neurons. *EMBO J*, 2007. 26(6): p. 1542-51.
740. El-Shewy, H.M., et al., Insulin-like growth factors mediate heterotrimeric G protein-dependent ERK1/2 activation by transactivating sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem*, 2006. 281(42): p. 31399-407.
741. Perron, A., et al., Sustained neurotensin exposure promotes cell surface recruitment of NTS2 receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 343(3): p. 799-808.
742. Bucci, C., et al., Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell*, 2000. 11(2): p. 467-80.

- 743. Vitelli, R., et al., Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway. J Biol Chem, 1997. 272(7): p. 4391-7.
- 744. Dubovsky, J.A., et al., Lymphocyte cytosolic protein 1 is a chronic lymphocytic leukemia membrane-associated antigen critical for homing. Blood, 2013. 122(19): p. 3308-16.
- 745. Reiners, K.S., et al., Soluble ligands for NK cell receptors promote evasion of chronic lymphocytic leukemia cells from NK cell anti-tumor activity. Blood, 2013. 121(18): p. 3658-65.

ANNEXE 1

The Implications of Sortilin/Vps10p Domain Receptors in Neurological and Human Diseases

The Implications of Sortilin/Vps10p Domain Receptors in Neurological and Human Diseases

Cornelia M. Wilson^{*,1}, Thomas Naves¹, Sofiane Saada¹, Sandra Pinet¹, François Vincent^{1,2}, Fabrice Lalloué¹ and Marie-Odile Jauberteau¹

¹EA3842 Homéostasie cellulaire et pathologies and Chaire de pneumologie expérimentale, Université de Limoges, Faculté de Médecine, 2, rue du Dr Raymond Marcland, 87025 Limoges CEDEX, France

²Service de Pathologie Respiratoire, Centre Hospitalier et Universitaire de Limoges, 87000 Limoges CEDEX, France

Abstract: The neurotensin receptor-3 also known as sortilin is part of the new receptor family of vacuolar protein sorting 10 protein domain. Growing evidence show that the vacuolar protein sorting 10 protein domain family is implicated as a genetic risk factor for neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, frontotemporal lobar degeneration, and Parkinson's disease, in addition to links associated with type 2 diabetes mellitus, lysosomal disorders, cardiovascular disease and atherosclerosis. In fact, sortilin expression is elevated in many human cell lines controlling the trafficking and release of neurotrophins. Hence, not surprisingly the imbalance of neurotrophin signaling is implicated in several human diseases. The fine regulation of the growth factor, brain derived nerve factor by sortilin mediates both neuronal and tumor cell survival, whereas in Alzheimer's disease sortilin mediated beta secretase-1 trafficking increases the cleavage of the beta-amyloid precursor protein. Perturbation of the autocrine/paracrine loop of neurotrophins in combination with the cell surface interaction of sortilin with neurotensin receptor 1 or 2 or tyrosine kinase receptor A or B are dramatically upregulated in both neurodegenerative diseases and cancer. In cardiovascular diseases, the circulatory low-density lipoprotein is closely correlated with sortilin expression in hepatocytes. Herein, this review discusses the multifaceted role played by sortilin and its interacting partners in human disease which could be interesting novel target(s) in drug discovery. Nevertheless, completely challenging the function of sortilin could prove unfavorable given the important universal role of sortilin plays in the body. Hence, metabolism disorders could be relieved with specific targeted therapeutic challenge of sortilin function.

Keywords: Alzheimer's disease, cancer, Parkinson disease, sortilin, type 2 diabetes mellitus, vacuolar protein sorting 10 protein.

INTRODUCTION

The vacuolar protein sorting 10 protein (Vps10p) domain was originally discovered as a sorting receptor in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) to traffic lysosomal enzymes from the Golgi to the vacuole [1]. This led to the discovery of other family members where receptors share the same characteristic N-terminal Vps10p domain. Vps10p is a type-1 transmembrane protein composed of a long extracellular domain and a short cytoplasmic domain (Fig. 1). The extracellular domain has two homologous regions with a C-terminal motif at the end of each region containing 10 cysteine residues (10CC motif). The distance between the cysteine residues is evolutionally conserved. In mammalian systems, 5 family members are known to exist that contain a Vps10p domain, Sortilin, SorLA, SorCS1, SorCS2, and SorCS3.

In this review we will evaluate the function and role of sortilin implicated in neurodegeneration and human disease.

SORTILIN FAMILY, ROLE AND FUNCTION

The sortilin family differ in structure, all members encode a single Vps10p domain (apart from Vps10p has two domains) spanning most of the extracellular part of the protein that plays an important role in protein interactions (Fig. 1). The sortilin family share an N-terminal proprotein convertase consensus cleavage sequence (RXXR). A number of studies have shown that the sortilin family are firstly synthesised as a precursor at the endoplasmic reticulum whilst at the trans-Golgi network (TGN) converted to a mature form by removal of the propeptide by proprotein convertase cleavage [2-6]. The cleavage of the propeptide of sortilin opens up the structure by exposing a ligand-binding region, hence increasing its affinity to propeptides and favouring ligand-binding [4, 5]. The N-terminal domain contains additional motifs such as Fibronectin-type III and shows the greatest diversity in function between Vps10p members. Conversely, the C-terminal region encodes 10 cysteine residues forming 5 disulphide bridges that are well conserved between species [7]. The crystal structure of the Vps10p domain shows that the folding of a 10-bladed beta propeller forms a tunnel measuring from 25 by 37 Å in diameter [8]. The large tunnel creates a potential ligand binding site whereby ligands such as neurotensin (NT) could

*Address correspondence to this author at the EA3842 Homéostasie cellulaire et pathologies and Chaire de pneumologie expérimentale, Université de Limoges, Faculté de Médecine, 2, rue du Dr Raymond Marcland, 87025 Limoges CEDEX, France; Tel: +33 (0)555435831; Fax: +33 (0)555435893; E-mail: cornelia.wilson@unilim.fr

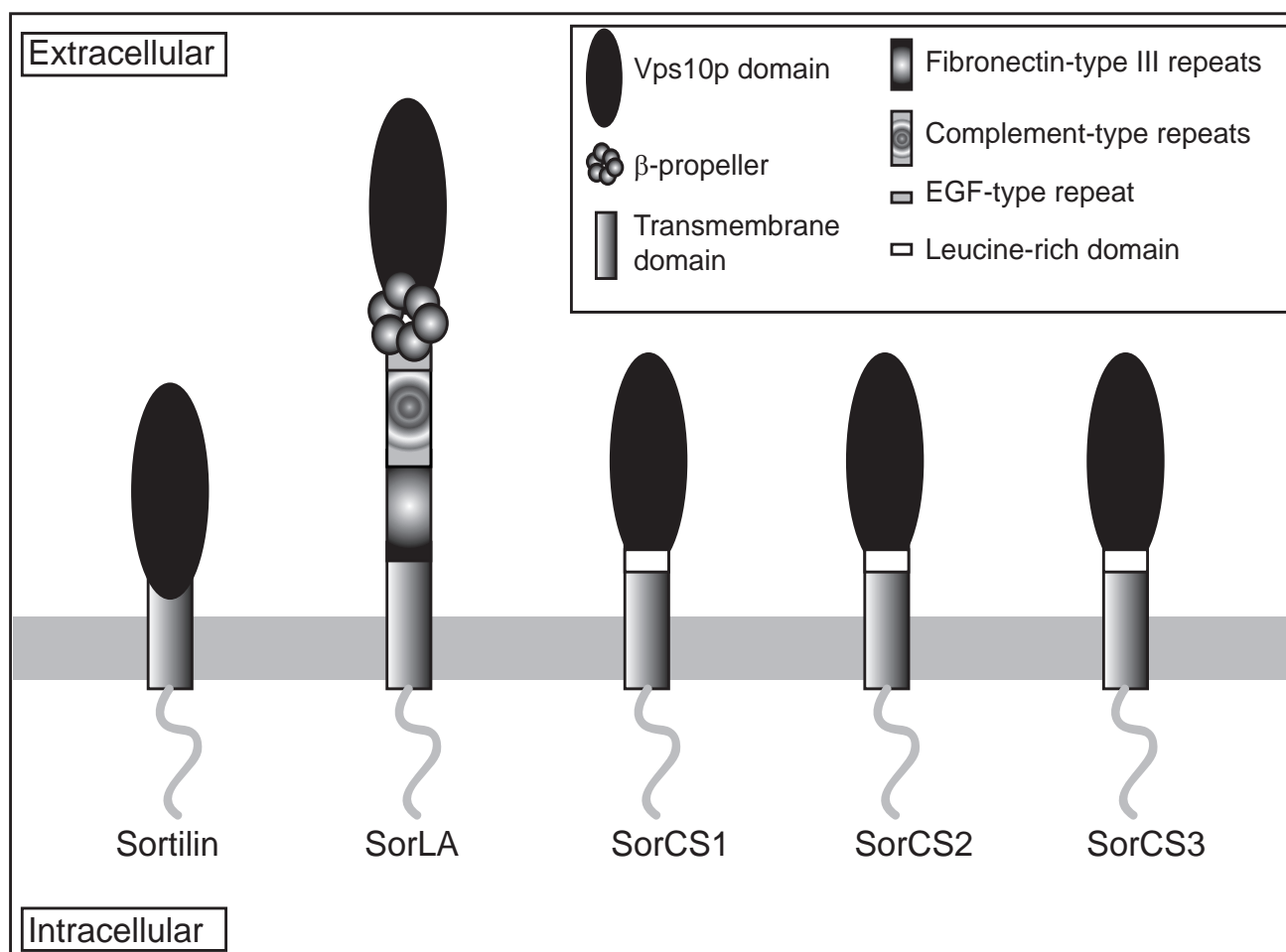


Fig. (1). The structural domains of human vacuolar protein sorting 10 protein (Vps10p)-domain receptors (sortilin, SORLA (sorting protein-related receptor with A-type repeats), SORCS1 (sortilin-related receptor CNS expressed 1), SORCS2 and SORCS3). The extracellular domains contain one or two Vps10p domains and additional protein interacting domains.

bind inside this cavity [8] (Fig. 2). It is unclear whether other pro-neurotrophins (pro-NT) such as proNGF (pro-nerve growth factor) use the same binding site. A study has shown that NT blocks proNGF interaction with sortilin suggesting that proNGF uses a similar ligand binding site [8, 9]. This suggests the complexity when proNTs interact with sortilin since the screening of a sortilin peptide library revealed that the surface of the beta-propeller within the region (163-174 amino acids) RIFRSSDFAKNF was required for receptor interaction with proNTs [10]. In addition, a peptide designed against this region (63-174 amino acids) can inhibit apoptosis induced by proNT in schwannoma cells [10]. Sortilin can associate with a number interacting partners in the cell, some of these protein interactions will be discussed and are summarised in the sortilin interactome (Fig. 3). Sortilin has a number of functions in the cell and the protein interactions affect its localisation reflecting the role of sortilin in protein trafficking (Fig. 2). Cleavage of the N-terminal propeptide allows the mature receptor to traffic to the cell surface through a constitutive secretory pathway. This allows sortilin to be exposed to ligands at the surface facilitating internalization of a ligand bound to sortilin

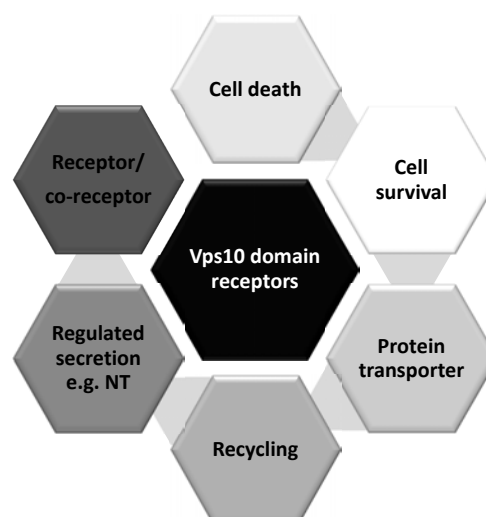


Fig. (2). Sortilin the multifaceted receptor. Schema to show the multitude roles played by sortilin in cell survival or cell death, in protein transport to the plasma membrane, recycling of binding partners to the lysosome, regulated secretion e.g. NT or as a receptor or co-receptor.

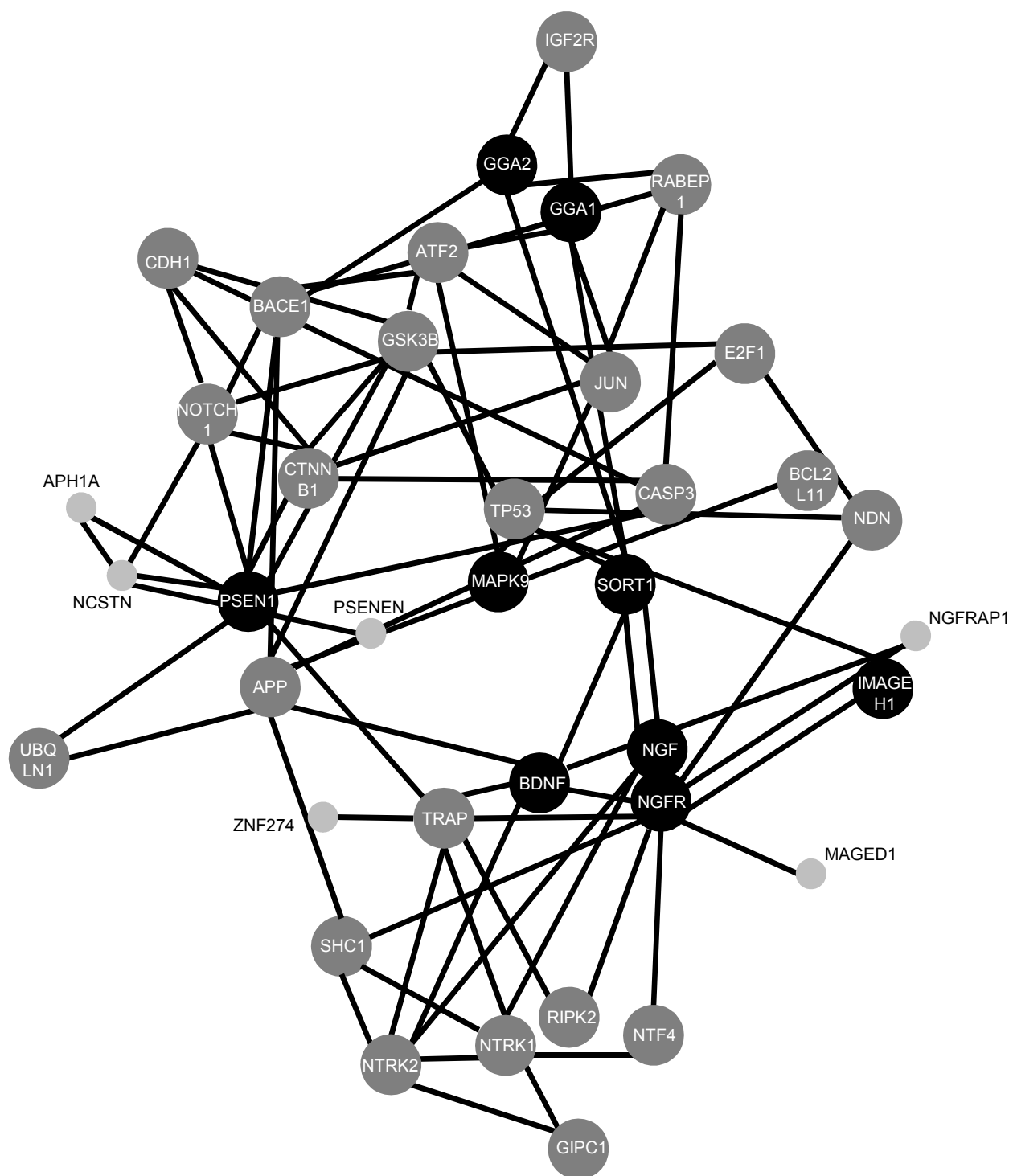


Fig. (3). Sortilin interactome. Networks were drawn using the String database as judged by experimental evidence.

through a clathrin-dependent pathway using clathrin-coated pits and binding to a cargo adaptor protein complex 2. There are three main complexes of cargo adaptor that interact with sortilin at specific C-terminal binding motifs mediating the transport of sortilin between the TGN and endosomes. Sortilin can traffic ligands from the cell surface to lysosomes and deliver their cargo from the TGN to the endosomes, this process is facilitated by the cargo adaptor proteins called c-

adaptin-ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding proteins (GGA) [11, 12]. In addition, sortilin trafficking has been demonstrated to be mediated by adaptor protein complex 1 whilst the retromer complex facilitates endosome to TGN recycling [13-16].

Sortilin's cytoplasmic tail shares similarity to the mannose-6-phosphate receptor with colocalisation to the

endosomes and endosome to TGN cargo vesicles [15]. In addition, sphingolipid activator proteins, acid sphingomyelinase, and cathepsin D and H have been shown to be trafficked by sortilin to the lysosomes [14, 17, 18]. These studies demonstrate that sortilin has a dual role both in endocytosis and in receptor trafficking allowing the correct sorting of ligands from the cell surface to lysosomes and the traffic of proNTs such as the neuropeptide NT, proNGF and brain-derived nerve growth factor (proBDNF) [2, 5, 9, 19-21]. A growing number of reports indicate that sortilin alone or in a complex along with neurotensin receptor 1 can regulate NT signaling [22]. Other ligands of sortilin that have been identified include thyroglobulin [23]. Thyroglobulin is a precursor of the thyroid hormone produced by thyroid epithelial cells and released into thyroid follicles to produce the thyroid hormones thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) [24]. Thyrocytes express sortilin which can bind to thyroglobulin with high-affinity in the endosomes, followed by trafficking to the lysosomes for degrade, and then by precursor recycling *via* transcytosis.

Sortilin being a multifaceted receptor plays a multitude of roles in the cell as a receptor or a co-receptor, in protein transport such as NT and neurotrophins to the plasma membrane and to lysosomes, and in the regulated secretion (Fig. 2) [25]. A number of reports indicate that sortilin expression is elevated in several human cell lines [26-28]. These same reports suggested that NT mediated by sortilin stimulated by an autocrine/paracrine function could be a mechanism associated with tumorigenesis [26-28]. In addition, several members of the Vps10p family of proteins including sortilin and also the partners of the retromer coat complex, are associated to genetic risk factors for human disorders such as Alzheimer's disease (AD), type 2 diabetes mellitus (T2DM), frontotemporal lobar degeneration, and Parkinson's disease (PD). Herein, we will discuss in the following sections the connections that associate sortilin with each human disease.

ALZHEIMER'S DISEASE

The fatal neurodegenerative disorder, AD characterized pathologically by the accumulation of tangles and senile plaques linked to the eventual loss of neurons in the hippocampus region of the brain. Senile plaques are mainly consisting of amyloid- β peptides- A β 40 and A β 42 derived from the β -amyloid precursor protein (APP) *via* the action of two proteolytic enzymes, namely the β - and γ -secretase. The β -secretase-amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1) is a transmembrane aspartyl protease which first cleaves APP into a soluble ectodomain and a membrane-tethered stub that is subjected to further cleavage by the γ -secretase [29, 30]. The γ -secretase mediates proteolytic cleavage of APP generating amyloid peptides (A β 40 and A β 42) and an intracellular fragment [31]. A growing number of studies indicate that the Vps10p domain receptors could play a role in AD [32-35]. The levels of sortilin are found to be higher in the post-mortem brains of patients [33, 34]. In contrast, another study did not observe significant changes in sortilin expression but this may reflect the severity and stage of disease [36]. However, these discrepancies could be explained as a result of aging since the levels of proNGF increase naturally with aging along with increases in sortilin

protein in neurons [9, 32, 37, 38]. Sortilin interacts with a number of secretases, regulating and controlling the protein traffic through the secretory pathway. Sortilin interacts with β -secretase facilitating retrograde transport since deletion of the cytoplasmic tail results in the redistribution of BACE1 from the TGN to the endosome with a prolonged association of sortilin1-BACE1 [34]. Chimera analysis reveals that this relationship is specific for sortilin and is not observed with other Vps10p family members [34]. In addition, the expression of sortilin was correlated with increased BACE1 cleavage of APP, most probably through the promotion of BACE1 interacting with sortilin at the TGN. On the other hand, down-regulating sortilin expression directly affects the production of sAPP β and A β [34]. Moreover, the α - and γ -secretases have also been shown to interact with the sortilin family and mediate proteolytic cleavage of sortilin [39-41]. The cleavage of sortilin can occur both at the cell surface and intracellularly [41], most probably in an endocytic compartment. The significance of these cleavages is unclear but it might be a way to control the function of sortilin and its binding partners. For example, sortilin can interact with the prodomain of Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) allowing traffic to the secretory pathway. BDNF is a growth factor involved in the control of neuronal function such as differentiation, plasticity, and morphology. The proform of BDNF induces neuronal apoptosis and depression whilst the mature form promotes neuron growth, survival, and differentiation [20, 42]. A recent study has demonstrated that sortilin *via* its cytoplasmic tail binds to the prodomain of BDNF facilitating trafficking of BDNF through the secretory pathway [41]. Expression of a truncated sortilin representing the ectodomain released after cleavage by the α -secretase perturbed lysosomal targeting and BDNF degradation [41].

A fine balance exists in neurotrophin signaling, an imbalance is important for a number of neurodegenerative disorders, including AD, Huntington's disease, PD, anxiety and depressive disorders [43]. Amyloid β -peptide can interact and activate a number of membrane receptors, including the neurotrophins, tyrosine receptor kinase A (TrkA) and p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) [44] and even APP itself [45, 46]. A β -peptide is a neurotoxic agent to cells and is involved in oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and perturbed calcium homeostasis. A β -peptide neurotoxicity can be mediated by the neurotrophin receptor p75^{NTR} leading to neurodegeneration [47]. Recently, Saadipour and colleagues showed that the presence of A β 42 in culture media is sufficient to raise both mRNA and protein expression levels of sortilin mediated through p75^{NTR} that is time and dose-dependent in SH-SY5Y cells [33]. It is well appreciated that sortilin acts as a receptor to pro-neurotrophins proNGF and proBDNF in combination with the neurotrophin receptor p75^{NTR} [9, 20]. The mature neurotrophins such as NGF and BDNF support growth and survival whilst in contrast the pro-forms induce cell death. Pro-NTs are secreted by neuronal cells such as neurons and glia in response to trauma or in disease such as in the final phases of AD [48-53].

Apolipoprotein E (APOE) receptor is a cholesterol and lipid transporter expressed mainly in the liver and brain. APOE the main risk factor for the sporadic form of AD [54, 55]. APOE is mainly produced in the brain by microglia and astrocytes [56]. Given APOE function is fairly controversial

in neurodegeneration, it has been suggested to be involved in A β clearance, cell signaling, neurotoxicity, inflammation, and synaptic transmission [57-59]. One current theory proposed that APOE is able to sequester a soluble population of A β in the extracellular space thus facilitating uptake into neurons and catabolism of this peptide [59]. A recent study of neuronal cells has identified sortilin as the major player in the endocytic pathway to clear complexes of APOE to A β [60].

Recent studies have shown that TAR DNA binding protein 43 (TDP-43) found in ubiquitin and p62 inclusions in frontotemporal lobar degeneration (FTLD) and in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [61-63]. Furthermore, TDP-43 pathology is common in many neurodegenerative disorders, including AD, Lewy body disease and Guam Parkinson dementia complex [64]. For example, approximately 30% of patients with AD present with TDP-43 pathology implicating that TDP-43 may have a general role in neurodegeneration [64]. Familial frontotemporal dementia-ubiquitin positive has been connected to genetic alterations in the gene of progranulin (PGRN), and subsequently the major component of these inclusions has identified TDP-43. The tau gene (MAPT) resulting in frontotemporal dementia with parkinsonism is linked to chromosome 17 [61, 65, 66]. Interestingly, PGRN *via* its C-terminus can also associate with sortilin and is secreted, thus acts as a mechanism to regulate PGRN levels and in addition may mediate degradation of other proteins such as TDP-43 [67]. Brain and serum levels of PGRN can be elevated between 2.5 to 5 fold with the down-regulation of sortilin. Together, these data highlight the connections to disease at the clinical level that is related to the important role played by sortilin in the cellular uptake and endocytosis of PGRN [67].

PARKINSON'S DISEASE

PD is the second common neurodegenerative disease observed in humans, characterised by motor symptoms of bradykinesia, resting tremor, rigidity and instability of posture and balance. It is due to the progressive impairment and death of dopamine neurons located to the substantia nigra that display some neuronal cell death to several neurotoxins such as lactacystin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, 6-hydroxydopamine, in PD animal models [68-70]. Interestingly, proNGF levels controlled through proNGF-p75^{NTR}-sortilin signaling are raised in AD patients [48, 52, 71], implicated in spongiform encephalomyelopathy [72] and also in the progression and pathogenesis of PD [73]. The hallmark of PD is characterised by the presence of Lewy bodies and Lewy neuritis that consist of aggregated alpha-synuclein (α -syn) found in fibrillar protein assemblies in neuronal cells [74, 75]. Neuronal α -syn is normally involved in regulating synaptic vesicle release and trafficking, binding of fatty acids and survival [76]. A recent study showed that the expression of NGF and TrkA was elevated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treated wild-type mice, but not in an autosomal dominant form of PD, the Ala30Pro (A30P) mutation α -syn expressing mice [77]. Conversely, gene expression of sortilin and p75^{NTR} were higher in A30P α -syn expressing animals [77].

TYPE 2 DIABETES

Diabetes mellitus is a metabolic disorder associated with chronic hyperglycemia. Diabetes mellitus is divided into two main types, type 1 and type 2 [78]. The subtypes of diabetes mellitus vary with respect to etiology, pathogenesis, and insulin availability, with the same outcomes of chronic hyperglycemia and impaired insulin action [79]. Type 1 diabetes mellitus is a result of an immune-mediated attack (autoimmune) by T-cells on the insulin-producing beta cells of the pancreas, the islets of Langerhans which subsequently leads to beta cell loss and insulin deficiency [80]. This disease affects people irrespective of age but is more common in children and young adults and often termed 'juvenile-onset diabetes'. The most common type is T2DM, triggered by insulin resistance and a partial insulin deficiency in the body associated to aging, hereditary, obesity and physical inactivity [79]. Insulin resistance, defined as a defective response of the insulin specific tissues such as adipose tissue, skeletal muscle, and the liver to the biological effect of insulin circulating that subsequently could result in raised insulin levels. A growing number of studies have linked members of the sortilin family (SorCS1) to diabetes [81-84]. The Rotterdam study implicated that patients with T2DM are at a greater risk to develop the diseases such as dementia and AD, data from studies in the clinic and in epidemiology have given additional confirming evidence to support the links between AD and T2DM [85, 86]. The SorCS1 gene was initially discovered as a T2DM quantitative trait locus in rodents [81, 82]. Subsequent studies identified SorCS1 in Genome-Wide Association Study (GWAS) to be a risk factor for T1DM and T2DM [83, 84, 87]. In addition, SorCS1 was characterized as a possible risk factor for late-onset AD [88] and subsequent studies have underlined a function for SorCS1 in regulating APP metabolism and A β generation [89, 90]. In fact, SorCS1 role in A β generation could be regulated by the retromer complex [89]. Since interacting partners found in mouse brain complexes consisting of: SorCS1:APP, SorCS1:SortL1, and SorCS1:Vps35, and at the same time, the protein levels of Vps35 and SortL1 are downregulated in SorCS1-deficient mice, indicating that the possible disruption of the retromer in the absence of SorCS1 [89]. Interestingly, this study found that female Sorcs1-deficient mice had higher levels of endogenous A β correlated with genetic studies of the female population presenting with AD and T2DM [83, 88]. However, the principal mechanism of how SorCS1 contributes to retromer regulation remains poorly understood. Nonetheless, recent data is emerging that indicates disruption of SorCS1 trafficking leads to a disturbance in endosomal trafficking and subsequent misrouting of APP and/or its proteolytic products [91]. A tyrosine-based internalization motif at positions ¹¹³²YAQM¹¹³⁵ within the SorCS1 cytoplasmic tail appears to be important for the function of the retromer complex [91]. This region of SorCS1 is interesting as it lies close to the transmembrane domain and upstream of a potential γ -secretase cleavage at positions ¹¹²¹KFKR¹¹²⁴ [39]. Thus, it remains unclear how SorCS1 contributes to T2DM, even so its interaction with the retromer complex common among the sortilin family indicates a link between T2DM and AD. It is well appreciated that sortilin regulates the intracellular transport of GLUT4 (glucose transporter type 4) and is

adequate for GLUT4 storage vesicles formation [92-97]. Other Vps domain proteins (SorL and Vps35) have been identified in rat adipocytes [98]. In response to insulin, the recycling of GLUT4 storage vesicles from the endocytic pathway to the TGN is reliant upon retrograde secretory pathways and is required for efficient GLUT4 trafficking [99]. Notwithstanding, SorCS1 and Vps26a have connections to T2DM [83, 84] whilst SORT1 gene has been associated to cardiovascular disease (CVD) [100], both are independent risk factors for late-onset AD. For further reading on the role of GLUT4 in human disease including diabetes the readers are recommended to see [101].

CARDIOVASCULAR DISEASE

CVD involving the heart, the blood vessels (arteries, capillaries, and veins) or both, is a leading cause of mortality and morbidity in developed countries. There are multiple risk factors that contribute to CVD such as age, genetics, sex, smoking habits, diabetes and hypertension or hypercholesterolemia. In recent years, technology has progressed giving rise to next-generation sequencing to make way for Genome-Wide Association Study of population based cohorts. With these given advances, it was possible to identify single nucleotide polymorphisms within or close to genes linked that control plasma and lipoprotein levels in particular low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) levels [102-110]. The most important region identified to chromosome 1p13 which was linked to both plasma LDL-C and myocardial infarction in humans [100, 102, 105, 111]. More than 100 loci have been discovered that are responsible for genetical variation in low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein cholesterol and triglyceride levels [108]. The most significant single nucleotide polymorphisms are observed in a gene cluster consisting of four genes including the SORT1 gene for sortilin. Hence, sortilin is associated as a major risk factor for CVD [100]. However, the functional role of sortilin plays in the pathogenesis process still remains to be elucidated. The role of sortilin on LDL cholesterol and coronary artery disease has been controversial in subsequent studies. Initially, it was proposed that the increased expression of sortilin leads to elevated internalisation of LDL and at the same time reducing plasma levels [112]. In contrast, Musunuru *et al.* report from a human cohort analysis of hepatocytes and rodent model that the expression of sortilin and LDL-C circulating were regulated by a transcriptional event through C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein) [100]. On the other hand, the expression of sortilin has been linked to the circulatory LDL concentration, implicating that this could be due to raised VLDL secretion [113]. The proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) previously identified as a variant implicated in lipid metabolism [103] functions in the cell to target LDL receptor for degradation in lysosomes. In a recent study, sortilin has been shown to be colocalised with PCSK9 in the TGN and mediates its secretion from hepatocytes [114]. In both a mouse model and in a human cohort, the expression of sortilin mirrored the plasma levels of PCSK9 i.e. sortilin overexpression conferred elevated plasma PCSK9 [114]. Discrepancies between the studies discussed could be due to the multifaceted nature of sortilin itself. Altogether these

studies implicate strongly that sortilin is a regulator of plasma LDL-C levels playing an important role in lipid metabolism.

OTHER DISEASES

Given the important role sortilin plays in the biosynthetic pathway, it is not surprising that sortilin is implicated in a growing list of human diseases including α -1 antitrypsin deficiency (ATD), amyotrophic lateral sclerosis (ALS), lysosomal storage disease (I-cell disease, Fabry disease) and even cancer.

The human disease α -1 antitrypsin deficiency (α 1ATD) is a genetic disorder leading to decreased α -1 antitrypsin (α 1AT) activity in the blood and lungs, and accumulation of excessive abnormal α 1AT protein in liver cells. It is the most common genetic disorder, affecting between 1 in 600 and 1 in 2000 individuals in Europe, whilst in the USA between 1 in 3000 and 1 in 6000 individuals present with the disease [115, 116]. There is often a time-delay (up to 8.3 years) from when the patients present with the first symptoms of α 1ATD to finding a diagnosis [117, 118]. The common cause of α 1ATD is homozygosity for the mutation that contributes to the Z variant of AT (α 1ATZ), which is defective in folding and secretion. A build-up of α 1ATZ in the liver leads to α 1AT deficiency in the lungs but at the same time α 1ATZ can aggregate and accumulate in the liver [119]. A recent higher eukaryotes genetic screening of conserved genes that affect α 1ATZ secretion identified sortilin as a key player [120]. This study implicated that α 1ATZ could be degraded in the vacuole after targeting from the Golgi, sortilin is believed to deliver aberrant proteins to the vacuole [120]. This study is the first to highlight that modification of sortilin levels could alter the severity of α 1ATZ-associated liver disease.

Lysosomal storage diseases (LSD) (approx. 60) are rare hereditary metabolic disorders caused by defects in the function of the lysosome [121, 122]. LSD manifest as a consequence of lacking a specific enzyme necessary for lipid metabolism or glycosylation resulting in defects in lysosomal degradation. LSDs commonly are caused by the deficiency of a hydrolase, an activator or transporter resulting in buildup of substrates at the lysosome. Most substrates are trafficked to lysosomes by two mannose-6-phosphate receptors by the addition of specific mannose-6-phosphate residue to the synthesized hydrolases [123]. A majority of the LSDs are inherited autosomally recessive for example, Niemann-Pick disease, type C whilst only some are recessively X-linked inherited such as Hunter syndrome and Fabry disease. A number of studies have demonstrated the role of sortilin facilitating transport from the Golgi to the lysosome of many lysosomal proteins including sphingolipid activator proteins such as prosaposin and GM2 activator protein; acid sphingomyelinase, cathepsins H and D [17, 124-126]. The role played by sortilin in LSDs has been previously reviewed [127].

Cancer is a chronic disease defined as a malignant neoplasm resulting from uncontrollable cell growth [128]. There are more than 200 different types of cancer that have been classified. Cancer can be caused by a number of factors such as genetic; lifestyle such as diet, tobacco use, and

exercise; some infections; and environmental contact to certain chemicals and radiation. Cancer cells divide and extensively proliferate to form malignant tumors that are able to invade neighbouring tissues. Also the cancer may invade the rest of the body using the blood/lymphatic system, this is the start of metastasis. Before invasion and metastasis, the tumor cells need to invade through tissues towards blood vessels allowing a replenishment of fuel such as nutrients and oxygen and also the ability to remove waste products and carbon dioxide. Hence, the tumor induces local angiogenesis, a vascularisation process mediating new blood vessels to enter the tumor through weak cell-cell junctions creating a route for tumor cells to exit [129].

Given the important function of pro-neurotrophin receptors such as sortilin play in cellular development, cell survival and death [130]. An imbalance in cellular homeostasis can be affected by neurotrophin signalling which could lead to the progression of cancer [130, 131]. Not surprising, sortilin expression is elevated in several human cancer cells including brain, prostate, colon, pancreas, skin, pituitary [26-28, 131, 132]. Some of the initial studies demonstrated that a furin-cleaved form of sortilin could bind NT at the cell surface [2, 5] and traffic NT to the endocytic pathway whilst maintaining a constant level of sortilin expression at the cell surface [19]. In a later study, sortilin was shown to be released from cells requiring cleavage of sortilin luminal domain by a protein kinase C-dependent protease [133]. However, the mechanism used for sortilin release from these cells and the consequence to the microenvironment is uncertain. In colon cancer, sortilin forms a dimeric complex with NTSR1 which is internalised upon NT stimulation [134]. The binding of NT to sortilin-NTSR1 and trafficking of this complex induces signaling pathways by modification of mitogen-activated protein (MAP) kinases and the turnover of phosphoinositide (PI) facilitated by NTSR1 [134]. It is not known why sortilin is released from cancer cells but evidence is now emerging to implicate that sortilin may modify the neighbouring cells/environment. Massa and colleagues studied the human adenocarcinoma epithelial cell line (HT29) to assess the ability of soluble sortilin to be released and internalised using radioreceptor assays and microscopy [135]. The binding of soluble sortilin is independent from the transactivation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) resulting in raised intracellular calcium concentration and significant activation of PI3 kinase pathway through Akt phosphorylation dependent upon of FAK/Src phosphorylation [135]. The PI3 kinase pathway is implicated in the survival mechanisms of cancer cells [136]. The action of soluble sortilin could be explained to have an autocrine/paracrine function.

However, it is important to remember that the immune system plays an important role in these diseases. Microglia cells are the resident macrophages located in the brain and spinal cord, and are the main immune defense in the CNS. The human microglial cell line C13NJ lacks the expression of NTSR1 and NTSR2 but sortilin is present. Neurotensin-treatment of these cells activates both PI3K and MAPK pathways (ERK1/2 and Akt) and thus elicits cell migration function [137]. Sortilin is already expressed in Natural Killer cells [138] and B-Cells [139, 140], plays a crucial function in the cellular homeostasis, inducing cell death by its

interaction with p75^{NTR} receptor. Sortilin is up-regulated in macrophages in response to mycobacteria infection [141]. Bacteria destroy antigen processing, loading and phagosome maturation in monocyte cell processes implicating many acidic enzymes, mediating sphingomyelinase and prostatic transport from the Golgi to phagosomes in dendritic cells [142]. The Sortilin^{-/-} mouse model perturbs secretory lysosomes (Granzyme A), therefore increases the cytotoxic function of the cytotoxic T-lymphocytes and Natural Killer cells. The same model induces an interferon- γ retention in the TGN, and its accumulation in the early endosome [143].

The lipopolysaccharides treatment of skin dendritic cells decreases NTSR1, NTSR2 and sortilin expression [144]. On the other hand, NT down regulates the pro-inflammatory properties of these cells [144]. In microglial C13NJ cells, sortilin mediates cytokines and chemokine expression [145]. Larsen and colleagues demonstrated that sortilin facilitated the signaling of ciliary neurotrophic factor through gp130/leukemia inhibitor factor receptor and STAT3 activation [146]. Ciliary neurotrophic factor belongs to the helical type-I cytokine receptor family which includes interleukins -6 and -11, leukemia inhibitor factor, oncostatin M, playing key roles in physiological and pathophysiological processes.

A number of reports have hinted that NT mediated by sortilin stimulated by an autocrine/paracrine function could be a mechanism associated with tumorigenesis [26-28]. The cell responds to two types of neurotrophin signal, one elicited by the p75^{NTR} and the other by Trk tyrosine kinase receptors [147]. Sortilin can interact with either of these receptors but the consequential outcome affects cell survival. Sortilin traffics from the TGN to the cell surface through the secretory pathway where it interacts with p75^{NTR} that can signal a pro-neurotrophin-induced cell death. The signals induce cell death by the pathway of c-Jun N-terminal kinase 3 and caspases 3, 6 and 9 [49, 53, 148, 149]. Trk interaction with sortilin promotes cell survival and in the case of neuronal cells stimulates cell survival, differentiation, innervation and plasticity /effect cell survival. Sortilin can associate with all the Trk receptors (A, B and C) [130, 131] implicating an important role in cell survival that is disrupted in human disease.

CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVES

In this review we have examined the global role of Vps10p domain receptors namely sortilin play in neurodegeneration and human disease (summarised in Table 1). Sortilin plays a multitude of roles in the cell as a receptor/co-receptor, as a protein transporter in the secretory pathway and in regulated secretion. The expanding list of sortilin interacting partners will identify and highlight the mechanistic role of sortilin in human disease (Table 1) and at the same time, the importance of studying the role of Vps10p domain receptors. Sortilin expression levels both at the transcript and protein level are modulated in different human diseases with growing evidence for both genetic risk and direct interaction. Recently, a novel specific sortilin inhibitor (A38469) was developed which could prove a useful tool for studying sortilin and disease mechanisms [150]. Future therapeutic strategies in drug discovery are required to challenge the function of sortilin in human diseases.

Table 1. Table showing sortilin interacting partners, the role of sortilin and the human associated-disease [152, 153].

Sortilin Interacting Partners	Role	Associated-Disease	References
APP	Protein trafficking	AD	[45, 46, 88]
Progranulin	Protein trafficking	FTLD, AD (TDP-43)	[66]
NTSR1	Cell signalling	Cancer (colon)	[133, 136, 150]
HAP1	Localised to stigmoid bodies	Neurological and psychiatric disorders?	[151, 152]
GGA	Protein trafficking	AD, LSD?	[11]
AP1-2	Protein trafficking	AD, LSD?	[13-16]
GLUT4	Protein trafficking and GSV formation	T2DM	[91-96]
SAPS	Protein trafficking	I-cell disease	[17]
Trks	Cell survival	Cancer (colon)	[129, 130]
BDNF (mature/proform)	Protein trafficking, BDNF promotes cell survival whilst proBDNF causes apoptosis	Cancer (leukemia), AD, depression	[20, 68, 139]
Secretases (α , β , & γ)	Protein trafficking	AD	[34, 39-41]
p75 ^{NTR}	Cell death	Cancer, AD	[49, 53, 147, 148]
Cathepsins D/H	Protein trafficking	LSD	[125]
α 1ATZ	Protein trafficking	ATD	[119]

AD, Alzheimer's disease; AP1-2, activator protein-1 -2; APP, amyloid precursor protein; ATD, α -1 antitrypsin deficiency; aATZ, Z variant of α -1 antitrypsin; BDNF, brain derived nerve factor; FTLD, frontotemporal lobar degeneration; GGA, c-adaptin-ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding proteins; GLUT4, glucose transporter type 4; HAP1, Huntingtin-associated protein-1; LSD, lysosomal storage diseases; NTSR1, neurotensin receptor-1; p75^{NTR}, p75 neurotrophin receptor; SAPS, sphingolipid activator proteins; T2DM, type 2 diabetes mellitus; TDP-43, TAR DNA binding protein 43; Trks, tyrosine kinase receptors.

Nevertheless, to completely challenge the function of sortilin could prove detrimental to the cell/organism given the important ubiquitous role of sortilin plays in every cell in the body. Nanotechnology targeting based drug therapy could offer the possibilities to target active molecules only to the site of action, without affecting other organs. Therefore, a fine tune balance of sortilin action in the cell would be necessary and most beneficial [151].

LIST OF ABBREVIATIONS

α -syn	=	Alpha-synuclein
α 1ATZ	=	Z variant of antitrypsin
AD	=	Alzheimer's disease
APOE	=	Apolipoprotein E receptor
APP	=	Amyloid precursor protein
ATD	=	α -1 antitrypsin deficiency
BACE-1	=	Beta secretase-1
BDNF	=	Brain derived nerve factor
CVD	=	Cardiovascular disease
GLUT4	=	Glucose transporter type 4
LDL	=	Low-density lipoprotein
LDL-C	=	Lipoprotein-cholesterol
LSD	=	Lysosomal storage diseases
NT	=	Neurotensin
NTSR1	=	Neurotensin receptor-1
p75 ^{NTR}	=	p75 neurotrophin receptor

PCSK9	=	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PD	=	Parkinson's disease
PGRN	=	Progranulin gene
Pro-NT	=	Pro-neurotrophins
proNGF	=	Pro-nerve growth factor
T2DM	=	Type 2 diabetes mellitus
TDP-43	=	Transactive response DNA binding protein 43
TGN	=	Trans-Golgi network
TrkA/B	=	Tyrosine kinase receptor A or B
Vps10p	=	Vacuolar protein sorting 10 protein

CONFLICT OF INTEREST

There is no conflict of interest for this study.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to be generously supported by Chaire de Pneumologie Expérimentale from ALAIR-AVD (Limousin, France) and the Fondation of the University of Limoges.

REFERENCES

- [1] Marcusson EG, Horazdovsky BF, Cereghino JL, Gharakhanian E, Emr SD. The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* 1994; 77(4): 579-86.
- [2] Mazella J, Zsuzsger N, Navarro V, et al. The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 1998; 273(41): 26273-6.

- [3] Hermey G, Keat SJ, Madsen P, *et al.* Characterization of sorCS1, an alternatively spliced receptor with completely different cytoplasmic domains that mediate different trafficking in cells. *J Biol Chem* 2003; 278(9): 7390-6.
- [4] Jacobsen L, Madsen P, Jacobsen C, *et al.* Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *J Biol Chem* 2001; 276(25): 22788-96.
- [5] Munck Petersen C, Nielsen MS, Jacobsen C, *et al.* Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J* 1999; 18(3): 595-604.
- [6] Westergaard UB, Kirkegaard K, Sorensen ES, *et al.* SorCS3 does not require propeptide cleavage to bind nerve growth factor. *FEBS Lett* 2005; 579(5): 1172-6.
- [7] Westergaard UB, Sorensen ES, Hermey G, *et al.* Functional organization of the sortilin Vps10p domain. *J Biol Chem* 2004; 279(48): 50221-9.
- [8] Quistgaard EM, Madsen P, Groftehaug MK, *et al.* Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16(1): 96-8.
- [9] Nykjaer A, Lee R, Teng KK, *et al.* Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 2004; 427(6977): 843-8.
- [10] Serup Andersen O, Boisguerin P, Glerup S, *et al.* Identification of a linear epitope in sortilin that partakes in pro-neurotrophin binding. *J Biol Chem* 2010; 285(16): 12210-22.
- [11] Nielsen MS, Madsen P, Christensen EI, *et al.* The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J* 2001; 20(9): 2180-90.
- [12] Nielsen MS, Gustafsen C, Madsen P, *et al.* Sorting by the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein binding receptor SorLA. *Mol Cell Biol* 2007; 27(19): 6842-51.
- [13] Seaman MN. Identification of a novel conserved sorting motif required for retromer-mediated endosome-to-TGN retrieval. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 14): 2378-89.
- [14] Canuel M, Lefrancois S, Zeng J, Morales CR. AP-1 and retromer play opposite roles in the trafficking of sortilin between the Golgi apparatus and the lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366(3): 724-30.
- [15] Mari M, Bujny MV, Zeuschner D, *et al.* SNX1 defines an early endosomal recycling exit for sortilin and mannose 6-phosphate receptors. *Traffic* 2008; 9(3): 380-93.
- [16] McCormick PJ, Dumaresq-Doiron K, Pluviose AS, *et al.* Palmitoylation controls recycling in lysosomal sorting and trafficking. *Traffic* 2008; 9(11): 1984-97.
- [17] Lefrancois S, Zeng J, Hassan AJ, Canuel M, Morales CR. The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO J* 2003; 22(24): 6430-7.
- [18] Ni X, Morales CR. The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic* 2006; 7(7): 889-902.
- [19] Navarro V, Martin S, Sarret P, *et al.* Pharmacological properties of the mouse neurotensin receptor 3. Maintenance of cell surface receptor during internalization of neurotensin. *FEBS Lett* 2001; 495(1-2): 100-5.
- [20] Teng HK, Teng KK, Lee R, *et al.* ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 2005; 25(22): 5455-63.
- [21] Nilsson SK, Christensen S, Raarup MK, *et al.* Endocytosis of apolipoprotein A-V by members of the low density lipoprotein receptor and the VPS10p domain receptor families. *J Biol Chem* 2008; 283(38): 25920-7.
- [22] Mazella J, Vincent JP. Functional roles of the NTS2 and NTS3 receptors. *Peptides* 2006; 27(10): 2469-75.
- [23] Botta R, Lisi S, Pinchera A, *et al.* Sortilin is a putative postendocytic receptor of thyroglobulin. *Endocrinology* 2009; 150(1): 509-18.
- [24] Marino M, McCluskey RT. Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279(5): C1295-306.
- [25] Nykjaer A, Willnow TE. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci* 2012; 35(4): 261-70.
- [26] Dal Farra C, Sarret P, Navarro V, *et al.* Involvement of the neurotensin receptor subtype NTR3 in the growth effect of the neurotensin on cancer cell lines. *Int J Cancer* 2001; 92(4): 503-9.
- [27] Giorgi RR, Chile T, Bello AR, *et al.* Expression of neurotensin and its receptors in pituitary adenomas. *J Neuroendocrinol* 2008; 20(9): 1052-7.
- [28] Truzzi F, Marconi A, Lotti R, *et al.* Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J Invest Dermatol* 2008; 128(8): 2031-40.
- [29] Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, *et al.* Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999; 286(5440): 735-41.
- [30] Sinha S, Anderson JP, Barbour R, *et al.* Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 1999; 402(6761): 537-40.
- [31] Walter J, Kaether C, Steiner H, Haass C. The cell biology of Alzheimer's disease: uncovering the secrets of secretases. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11(5): 585-90.
- [32] Al-Shawi R, Hafner A, Olsen J, *et al.* Neurotoxic and neurotrophic roles of proNGF and the receptor sortilin in the adult and ageing nervous system. *Eur J Neurosci* 2008; 27(8): 2103-14.
- [33] Saadipour K, Yang M, Lim Y, *et al.* Amyloid beta (A β) up-regulates the expression of sortilin via the p75/RhoA signaling pathway. *J Neurochem* 2013; 127(2): 152-62.
- [34] Finan GM, Okada H, Kim TW. BACE1 retrograde trafficking is uniquely regulated by the cytoplasmic domain of sortilin. *J Biol Chem* 2011; 286(14): 12602-16.
- [35] Gustafsen C, Glerup S, Pallesen LT, *et al.* Sortilin and SorLA display distinct roles in processing and trafficking of amyloid precursor protein. *J Neurosci* 2013; 33(1): 64-71.
- [36] Mufson EJ, Wu J, Counts SE, Nykjaer A. Preservation of cortical sortilin protein levels in MCI and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2010; 471(3): 129-33.
- [37] Terry AV, Jr, Kutiyawalla A, Pillai A. Age-dependent alterations in nerve growth factor (NGF)-related proteins, sortilin, and learning and memory in rats. *Physiol Behav* 2011; 102(2): 149-57.
- [38] Xia Y, Chen BY, Sun XL, *et al.* Presence of proNGF-Sortilin Signaling Complex in Nigral Dopamine Neurons and Its Variation in Relation to Aging, Lactacystin and 6-OHDA Insults. *Int J Mol Sci* 2013; 14(7): 14085-104.
- [39] Nyborg AC, Ladd TB, Zwizinski CW, Lah JJ, Golde TE. Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates. *Mol Neurodegener* 2006; 1: 3.
- [40] Hermey G, Sjogaard SS, Petersen CM, Nykjaer A, Gliemann J. Tumour necrosis factor alpha-converting enzyme mediates ectodomain shedding of Vps10p-domain receptor family members. *Biochem J* 2006; 395(2): 285-93.
- [41] Evans SF, Irmady K, Ostrow K, *et al.* Neuronal brain-derived neurotrophic factor is synthesized in excess, with levels regulated by sortilin-mediated trafficking and lysosomal degradation. *J Biol Chem* 2011; 286(34): 29556-67.
- [42] Woo NH, Teng HK, Siao CJ, *et al.* Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci* 2005; 8(8): 1069-77.
- [43] Longo FM, Massa SM. Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: a strategy for the treatment of neurological disease. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12(7): 507-25.
- [44] Bulbarelli A, Lonati E, Cazzaniga E, *et al.* TrkA pathway activation induced by amyloid-beta (A β). *Mol Cell Neurosci* 2009; 40(3): 365-73.
- [45] Verdier Y, Zarandi M, Penke B. Amyloid beta-peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer's disease. *J Peptide Sci* 2004; 10(5): 229-48.
- [46] Rogueva E, Meng Y, Lee JH, *et al.* The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 2007; 39(2): 168-77.
- [47] Diarra A, Geetha T, Potter P, Babu JR. Signaling of the neurotrophin receptor p75 in relation to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390(3): 352-6.
- [48] Fahnstock M, Michalski B, Xu B, Coughlin MD. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci* 2001; 18(2): 210-20.
- [49] Harrington AW, Leiner B, Blechschmitt C, *et al.* Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(16): 6226-30.

- [50] Jansen P, Giehl K, Nyengaard JR, *et al.* Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat Neurosci* 2007; 10(11): 1449-57.
- [51] Kumar A, Sinha RA, Tiwari M, *et al.* Increased pro-nerve growth factor and p75 neurotrophin receptor levels in developing hypothyroid rat cerebral cortex are associated with enhanced apoptosis. *Endocrinology* 2006; 147(10): 4893-903.
- [52] Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnestock M. Increased proNGF levels in subjects with mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63(6): 641-9.
- [53] Volosin M, Song W, Almeida RD, *et al.* Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. *J Neurosci* 2006; 26(29): 7756-66.
- [54] Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, *et al.* Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261(5123): 921-3.
- [55] Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, *et al.* Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(17): 8098-102.
- [56] Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1987; 917(1): 148-61.
- [57] Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(15): 5644-51.
- [58] Holtzman DM, Herz J, Bu G. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2012; 2(3): a006312.
- [59] Carlo AS. Sortilin, a novel APOE receptor implicated in Alzheimer disease. *Prion* 2013; 7(5): 378-82.
- [60] Carlo AS. The pro-neurotrophin receptor sortilin is a major neuronal apolipoprotein E receptor for catabolism of amyloid-[beta] peptide in the brain. *J Neurosci* 2013; 33: 358-70.
- [61] Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, *et al.* Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314(5796): 130-3.
- [62] Deng HX, Zhai H, Bigio EH, *et al.* FUS-immunoreactive inclusions are a common feature in sporadic and non-SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2010; 67(6): 739-48.
- [63] King A, Maekawa S, Bodi I, Troakes C, Al-Sarraj S. Ubiquitinated, p62 immunopositive cerebellar cortical neuronal inclusions are evident across the spectrum of TDP-43 proteinopathies but are only rarely additionally immunopositive for phosphorylation-dependent TDP-43. *Neuropathology* 2011; 31(3): 239-49.
- [64] Dickson DW. TDP-43 immunoreactivity in neurodegenerative disorders: disease versus mechanism specificity. *Acta Neuropathol* 2008; 115(1): 147-9.
- [65] Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, *et al.* Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 1998; 393(6686): 702-5.
- [66] Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, *et al.* Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 2006; 442(7105): 916-9.
- [67] Hu F, Padukkavidana T, Vaegter CB, *et al.* Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. *Neuron* 2010; 68(4): 654-67.
- [68] Wu J, Yu W, Chen Y, *et al.* Intrastriatal transplantation of GDNF-engineered BMSCs and its neuroprotection in lactacystin-induced Parkinsonian rat model. *Neurochem Res* 2010; 35(3): 495-502.
- [69] Chen LW, Zhang JP, Kwok-Yan Shum D, Chan YS. Localization of nerve growth factor, neurotrophin-3, and glial cell line-derived neurotrophic factor in nestin-expressing reactive astrocytes in the caudate-putamen of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/Bl mice. *J Comp Neurol* 2006; 497(6): 898-909.
- [70] Chung EK, Chen LW, Chan YS, Yung KK. Downregulation of glial glutamate transporters after dopamine denervation in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Compar Neurol* 2008; 511(4): 421-37.
- [71] Pedraza CE, Podlesniy P, Vidal N, *et al.* Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR. *Am J Pathol* 2005; 166(2): 533-43.
- [72] Stoica G, Lungu G, Kim HT, Wong PK. Up-regulation of pro-nerve growth factor, neurotrophin receptor p75, and sortilin is associated with retrovirus-induced spongiform encephalomyelopathy. *Brain Res* 2008; 1208: 204-16.
- [73] Chen LW, Yung KK, Chan YS, Shum DK, Bolam JP. The proNGF-p75NTR-sortilin signalling complex as new target for the therapeutic treatment of Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2008; 7(6): 512-23.
- [74] Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2(7): 492-501.
- [75] Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(11): 6469-73.
- [76] Uversky VN, Eliezer D. Biophysics of Parkinson's disease: structure and aggregation of alpha-synuclein. *Curr Prot Peptide Sci* 2009; 10(5): 483-99.
- [77] Szego EM, Outeiro TF, Kermer P, Schulz JB. Impairment of the septal cholinergic neurons in MPTP-treated A30P alpha-synuclein mice. *Neurobiol Aging* 2013; 34(2): 589-601.
- [78] Wilson CM, Magnaudeix A, Yardin C, Terro F. Autophagy Dysfunction and its Link to Alzheimer's Disease and Type II Diabetes Mellitus. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2014; 13(2): 226-46.
- [79] Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diab Med* 1998; 15(7): 539-53.
- [80] Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994; 331(21): 1428-36.
- [81] Clee SM, Yandell BS, Schueler KM, *et al.* Positional cloning of Sorcs1, a type 2 diabetes quantitative trait locus. *Nat Genet* 2006; 38(6): 688-93.
- [82] Granhall C, Park HB, Fakhrai-Rad H, Luthman H. High-resolution quantitative trait locus analysis reveals multiple diabetes susceptibility loci mapped to intervals <800 kb in the species-conserved Niddm1l of the GK rat. *Genetics* 2006; 174(3): 1565-72.
- [83] Goodarzi MO, Lehman DM, Taylor KD, *et al.* SORCS1: a novel human type 2 diabetes susceptibility gene suggested by the mouse. *Diabetes* 2007; 56(7): 1922-9.
- [84] Koener JS, Saleheen D, Sim X, *et al.* Genome-wide association study in individuals of South Asian ancestry identifies six new type 2 diabetes susceptibility loci. *Nat Genet* 2011; 43(10): 984-9.
- [85] Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, *et al.* Diabetes mellitus and the risk of dementia: the rotterdam study. *Neurology* 1999; 53(9): 1937-42.
- [86] Han W, Li C. Linking type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(15): 6557-8.
- [87] Paterson AD, Waggott D, Boright AP, *et al.* A genome-wide association study identifies a novel major locus for glycemic control in type 1 diabetes, as measured by both A1C and glucose. *Diabetes* 2010; 59(2): 539-49.
- [88] Liang X, Slifer M, Martin ER, *et al.* Genomic convergence to identify candidate genes for Alzheimer disease on chromosome 10. *Hum Mutat* 2009; 30(3): 463-71.
- [89] Lane RF, Raines SM, Steele JW, *et al.* Diabetes-associated SorCS1 regulates Alzheimer's amyloid-beta metabolism: evidence for involvement of SorL1 and the retromer complex. *J Neurosci* 2010; 30(39): 13110-5.
- [90] Reitz C, Tokuhira S, Clark LN, *et al.* SORCS1 alters amyloid precursor protein processing and variants may increase Alzheimer's disease risk. *Ann Neurol* 2011; 69(1): 47-64.
- [91] Lane RF, Steele JW, Cai D, *et al.* Protein sorting motifs in the cytoplasmic tail of SorCS1 control generation of Alzheimer's amyloid-beta peptide. *J Neurosci* 2013; 33(16): 7099-107.
- [92] Shi J, Kandror KV. Sortilin is essential and sufficient for the formation of Glut4 storage vesicles in 3T3-L1 adipocytes. *Develop Cell* 2005; 9(1): 99-108.
- [93] Shi J, Kandror KV. The luminal Vps10p domain of sortilin plays the predominant role in targeting to insulin-responsive Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem* 2007; 282(12): 9008-16.
- [94] Lin BZ, Pilch PF, Kandror KV. Sortilin is a major protein component of Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem* 1997; 272(39): 24145-7.

- [95] Morris NJ, Ross SA, Lane WS, *et al.* Sortilin is the major 110-kDa protein in GLUT4 vesicles from adipocytes. *J Biol Chem* 1998; 273(6): 3582-7.
- [96] Huang G, Buckler-Pena D, Nauta T, *et al.* Insulin responsiveness of glucose transporter 4 in 3T3-L1 cells depends on the presence of sortilin. *Mol Biol Cell* 2013; 24(19): 3115-22.
- [97] Ariga M, Nedachi T, Katagiri H, Kanzaki M. Functional role of sortilin in myogenesis and development of insulin-responsive glucose transport system in C2C12 myocytes. *J Biol Chem* 2008; 283(15): 10208-20.
- [98] Jedrychowski MP, Gartner CA, Gygi SP, *et al.* Proteomic analysis of GLUT4 storage vesicles reveals LRP1 to be an important vesicle component and target of insulin signaling. *J Biol Chem* 2010; 285(1): 104-14.
- [99] Vassilopoulos S, Esk C, Hoshino S, *et al.* A role for the CHC22 clathrin heavy-chain isoform in human glucose metabolism. *Science* 2009; 324(5931): 1192-6.
- [100] Musunuru K, Strong A, Frank-Kamenetsky M, *et al.* From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature* 2010; 466(7307): 714-9.
- [101] Bogan JS. Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. *Annu Rev Biochem* 2012; 81: 507-32.
- [102] Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, *et al.* Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet* 2008; 40(2): 189-97.
- [103] Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, *et al.* Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet* 2008; 40(2): 161-9.
- [104] Wallace C, Newhouse SJ, Braund P, *et al.* Genome-wide association study identifies genes for biomarkers of cardiovascular disease: serum urate and dyslipidemia. *Am J Hum Genet* 2008; 82(1): 139-49.
- [105] Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, *et al.* Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet* 2009; 41(1): 56-65.
- [106] Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, *et al.* Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat Genet* 2009; 41(1): 47-55.
- [107] Sabatti C, Service SK, Hartikainen AL, *et al.* Genome-wide association analysis of metabolic traits in a birth cohort from a founder population. *Nat Genet* 2009; 41(1): 35-46.
- [108] Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, *et al.* Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 2010; 466(7307): 707-13.
- [109] Lange LA, Hu Y, Zhang H, *et al.* Whole-Exome Sequencing Identifies Rare and Low-Frequency Coding Variants Associated with LDL Cholesterol. *Am J Hum Genet* 2014; 94(2): 233-45.
- [110] Global Lipids Genetics C, Willer CJ, Schmidt EM, *et al.* Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat Genet* 2013; 45(11): 1274-83.
- [111] Tall AR, Ai D. Sorting out sortilin. *Circ Res* 2011; 108(2): 158-60.
- [112] Linsel-Nitschke P, Samani NJ, Schunkert H. Sorting out cholesterol and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2010; 363(25): 2462-3.
- [113] Kjolby M, Andersen OM, Breiderhoff T, *et al.* Sort1, encoded by the cardiovascular risk locus 1p13.3, is a regulator of hepatic lipoprotein export. *Cell Metab* 2010; 12(3): 213-23.
- [114] Gustafsen C, Kjolby M, Nyegaard M, *et al.* The Hypercholesterolemia-Risk Gene SORT1 Facilitates PCSK9 Secretion. *Cell Metab* 2014; 19(2): 310-8.
- [115] Stockley RA, Dirksen A, Stolk J. Alpha-1 antitrypsin deficiency: the European experience. *COPD* 2013; 10 Suppl 1: 50-3.
- [116] de Serres FJ, Blanco I, Fernandez-Bustillo E. PI S and PI Z alpha-1 antitrypsin deficiency worldwide. A review of existing genetic epidemiological data. *Mon Arch Chest Dis* 2007; 67(4): 184-208.
- [117] Campos MA, Wanner A, Zhang G, Sandhaus RA. Trends in the diagnosis of symptomatic patients with alpha1-antitrypsin deficiency between 1968 and 2003. *Chest* 2005; 128(3): 1179-86.
- [118] Stoller JK, Smith P, Yang P, Spray J. Physical and social impact of alpha 1-antitrypsin deficiency: results of a survey. *Cleveland Clin J Med* 1994; 61(6): 461-7.
- [119] Lomas DA, Evans DL, Finch JT, Carrell RW. The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* 1992; 357(6379): 605-7.
- [120] Gelling CL, Dawes IW, Perlmutter DH, Fisher EA, Brodsky JL. The endosomal protein-sorting receptor sortilin has a role in trafficking alpha-1 antitrypsin. *Genetics* 2012; 192(3): 889-903.
- [121] Journet A, Chapel A, Kieffer S, *et al.* Towards a human repertoire of monocytic lysosomal proteins. *Electrophoresis* 2000; 21(16): 3411-9.
- [122] Journet A, Chapel A, Kieffer S, Roux F, Garin J. Proteomic analysis of human lysosomes: application to monocytic and breast cancer cells. *Proteomics* 2002; 2(8): 1026-40.
- [123] Hille-Rehfeld A. Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1241(2): 177-94.
- [124] Nielsen MS, Jacobsen C, Olivecrona G, Gliemann J, Petersen CM. Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 1999; 274(13): 8832-6.
- [125] Ni X, Canuel M, Morales CR. The sorting and trafficking of lysosomal proteins. *Histol Histopathol* 2006; 21(8): 899-913.
- [126] Canuel M, Korkidakis A, Konnyu K, Morales CR. Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373(2): 292-7.
- [127] Coutinho MF, Prata MJ, Alves S. A shortcut to the lysosome: the mannose-6-phosphate-independent pathway. *Mol Genet Metab* 2012; 107(3): 257-66.
- [128] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-74.
- [129] Weis SM, Cheresh DA. alphaV integrins in angiogenesis and cancer. *Cold Spring Harbor Persp Med* 2011; 1(1): a006478.
- [130] Vaegter CB, Jansen P, Fjorback AW, *et al.* Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat Neurosci* 2011; 14(1): 54-61.
- [131] Akil H, Perraud A, Melin C, Jauberteau MO, Mathonnet M. Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival. *PloS One* 2011; 6(9): e25097.
- [132] Xiong J, Zhou L, Yang M, *et al.* ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells *in vitro*. *Neurooncology* 2013; 15(8): 990-1007.
- [133] Navarro V, Vincent JP, Mazella J. Shedding of the luminal domain of the neurotensin receptor-3/sortilin in the HT29 cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298(5): 760-4.
- [134] Martin S, Navarro V, Vincent JP, Mazella J. Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterol* 2002; 123(4): 1135-43.
- [135] Massa F, Devader C, Beraud-Dufour S, *et al.* Focal adhesion kinase dependent activation of the PI3 kinase pathway by the functional soluble form of neurotensin receptor-3 in HT29 cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45(5): 952-9.
- [136] Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(8): 627-44.
- [137] Martin S, Vincent JP, Mazella J. Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia. *J Neurosci* 2003; 23(4): 1198-205.
- [138] Rogers ML, Bailey S, Matusica D, *et al.* ProNGF mediates death of Natural Killer cells through activation of the p75NTR-sortilin complex. *J Neuroimmunol* 2010; 226(1-2): 93-103.
- [139] Fauchais AL, Boumediene A, Lalloue F, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor correlate with T-cell activation in primary Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 2009; 38(1): 50-7.
- [140] Fauchais AL, Lalloue F, Lise MC, *et al.* Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J Immunol* 2008; 181(5): 3027-38.
- [141] Gutierrez MG, Mishra BB, Jordao L, *et al.* NF-kappa B activation controls phagolysosome fusion-mediated killing of mycobacteria by macrophages. *J Immunol* 2008; 181(4): 2651-63.
- [142] Wahe A, Kasmapour B, Schmaderer C, *et al.* Golgi-to-phagosome transport of acid sphingomyelinase and prosaposin is mediated by sortilin. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 14): 2502-11.
- [143] Herda S, Raczkowski F, Mittrucker HW, *et al.* The sorting receptor Sortilin exhibits a dual function in exocytic trafficking of interferon-gamma and granzyme A in T cells. *Immunity* 2012; 37(5): 854-66.
- [144] da Silva L, Neves BM, Moura L, Cruz MT, Carvalho E. Neurotensin downregulates the pro-inflammatory properties of skin

- dendritic cells and increases epidermal growth factor expression. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813(10): 1863-71.
- [145] Dicou E, Vincent JP, Mazella J. Neurotensin receptor-3/sortilin mediates neurotensin-induced cytokine/chemokine expression in a murine microglial cell line. *J Neurosci Res* 2004; 78(1): 92-9.
- [146] Larsen JV, Hansen M, Moller B, *et al.* Sortilin facilitates signaling of ciliary neurotrophic factor and related helical type 1 cytokines targeting the gp130/leukemia inhibitory factor receptor beta heterodimer. *Mol Cell Biol* 2010; 30(17): 4175-87.
- [147] Schecterson LC, Bothwell M. Neurotrophin receptors: Old friends with new partners. *Develop Neurobiol* 2010; 70(5): 332-8.
- [148] Skeldal S, Matusica D, Nykjaer A, Coulson EJ. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor: A prerequisite for signalling?: Neuronal life, growth and death signalling are crucially regulated by intra-membrane proteolysis and trafficking of p75(NTR). *BioEssays* 2011; 33(8): 614-25.
- [149] Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Phil Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* 2006; 361(1473): 1545-64.
- [150] Schroder TJ, Christensen S, Lindberg S, *et al.* The identification of AF38469: an orally bioavailable inhibitor of the VPS10P family sorting receptor Sortilin. *Bioorg Med Chem Lett* 2014; 24(1): 177-80.
- [151] Saada S, Marget P, Fauchais AL, *et al.* Differential expression of neurotensin and specific receptors, NTSR1 and NTSR2, in normal and malignant human B lymphocytes. *J Immunol* 2012; 189(11): 5293-303.
- [152] Gutekunst CA, Torre ER, Sheng Z, *et al.* Stigmoid bodies contain type I receptor proteins SorLA/LR11 and sortilin: new perspectives on their function. *J Histochem Cytochem* 2003; 51(6): 841-52.
- [153] Xiang J, Yang H, Zhao T, *et al.* Huntingtin-associated protein 1 regulates postnatal neurogenesis and neurotrophin receptor sorting. *J Clin Invest* 2014; 124(1): 85-98.

Received: March 22, 2014

Revised: May 22, 2014

Accepted: May 23, 2014

Résumé

Les neurotrophines sont des facteurs de croissance initialement découverts dans le système nerveux et ayant pour rôle de contrôler la croissance, la prolifération et la survie des cellules neuronales et astrocytaires, mais aussi dans de nombreux autres tissus. Les neurotrophines peuvent interagir avec leurs récepteurs de haute affinité Trks. Les travaux précédemment réalisés au sein de notre équipe ont mis en évidence une boucle de régulation autocrine, en réponse à un stress cellulaire, et ce de façon dépendante des neurotrophines, notamment du BDNF, dans plusieurs lignées lymphocytaires B humaines, à différents stades de différenciation. Les cellules produisent du BDNF qui agit de manière autocrine sur son récepteur spécifique, TrkB. Le transport du BDNF est assuré par la sortiline, une protéine à domaine Vps10. Les neurotrophines sont également synthétisées sous forme de progéniteurs biologiquement actifs, les pro-neurotrophines. Le pro-BDNF interagit avec le récepteur aux neurotrophines à domaine de mort p75^{NTR}, l'interaction du pro-BDNF avec le récepteur p75^{NTR} et de son co-récepteur, la sortiline, induit l'apoptose des lymphocytes B. La sortiline est exprimée dans les lymphocytes B humains, les lignées de lymphocytaires B. La sortiline, également appelée NTSR3, peut lier un autre neuropeptide, la neurotensine (NTS). Identifiée, dans le système nerveux, où elle joue un rôle de neurotransmetteur, impliqué dans l'analgésie et la thermorégulation. Elle est également présente dans le tube digestif, où elle est impliquée dans la régulation de la digestion et le contrôle et de la glycémie. La fonction de la neurotensine est associée à l'activation de la sortiline mais aussi de ses deux récepteurs à protéine G, le récepteur de haute affinité, NTSR1 et le récepteur de faible affinité, NTSR2. La NTS est impliquée dans l'oncogenèse de nombreux cancers solides *via* sa liaison au récepteur NTSR1 principalement mais également au récepteur NTSR2, notamment dans un modèle de cancer prostatique. Nous avons démontré pour la première fois l'expression de la neurotensine et de ses récepteurs NTSR1 et NTSR2 dans les lymphocytes B humains. Le stress pro-apoptotique induit par la privation sérique favorise une relocalisation des récepteurs NTSR1 et sortiline à la membrane plasmique. Au sein de ces cellules, la neurotensine induit une augmentation de la prolifération et une diminution de l'apoptose. Ces effets de la NTS sont bloqués par l'inhibiteur de NTSR1, le SR48692/Meclintant. Les analyses transcriptionnelles ont détecté une surexpression du récepteur NTSR2 au sein des lymphocytes B purifiés de patients ayant une LLC et au niveau des ganglions de patients atteints de lymphomes B en revanche, l'expression de la neurotensine est réduite. La surexpression de NTSR2 induit l'activation transcriptionnelle de TrkB, autre récepteur exprimé par ces lignées comme par les cellules de LLC de patients. La co-localisation de ces 2 récepteurs a été démontrée. Ce complexe protéique induit l'activation des voies de signalisation ERK, p38MAPK et JNK, après traitement par le BDNF, le ligand de TrkB. Ces données suggèrent un phénomène de transactivation entre ces 2 récepteurs, dépendant des métalloprotéases. Le blocage de l'internalisation de ce complexe protéique, induit une augmentation de l'activation des voies de signalisation. Le trafic intra-cellulaire endosomal de ce complexe apparaît perturbé dans les cellules surexprimant NTSR2, ce qui pourrait conduire à son accumulation comme cela est détecté dans les cellules de LLC. Ces cellules leucémiques se caractérisent également par une production d'exosomes contenant le complexe TrkB/NTSR2, sécrété en extra-cellulaire et retrouvé en excès dans le plasma des patients en comparaison à des témoins volontaires sains.